

Rodrigo Antonio Mattei

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO
ETANERCEPT UTILIZANDO-SE O MODELO DE
INFLAMAÇÃO POR CARRAGENINA, NA BOLSA DE AR, EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
farmácia, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Tânia
Silvia Fröde.

Florianópolis
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Rodrigo Antonio Mattei

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO
ETANERCEPT UTILIZANDO-SE O MODELO DE
INFLAMAÇÃO POR CARRAGENINA, NA BOLSA DE AR, EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
farmácia, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Tânia
Silvia Fröde.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mattei, Rodrigo Antônio

Avaliação dos efeitos do etanercept sobre a resposta
inflamatória induzida pela carragenina no modelo murino da
bolsa de ar. / Rodrigo Antônio Mattei ; orientadora, Profa.
Dra. Tânia Sílvia Fróde ; coorientador, Prof. Dr. Eduardo
Monguilhott Dalmarco. - Florianópolis, SC, 2015.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Bolsa de ar. 3. Marcadores
Inflamatórios. 4. Apoptose. I. Fróde, Profa. Dra. Tânia
Sílvia. II. Dalmarco, Prof. Dr. Eduardo Monguilhott. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. IV. Título.

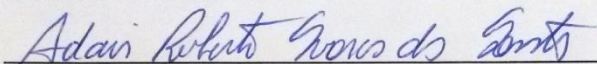
**“Estudo do efeito anti-inflamatório do Etarnecept
utilizando-se o modelo de inflamação por carragenina,
na bolsa de ar, em camundongos”**

POR

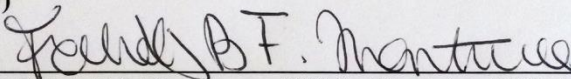
Rodrigo Antônio Mattei

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

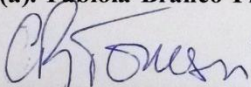
Banca Examinadora:



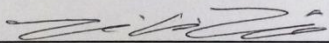
Prof(a). Dr(a). Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Fabíola Branco Fillipin Monteiro (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Carlos Rogério Tonussi (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Tânia Silvia Fröde (UFSC – Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho a meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais e a minha família por terem me dado todo o apoio e suporte necessário para completar este projeto.

A Vanessa Fernandes Cesari, minha noiva por ficar ao meu lado em todos os momentos deste trabalho.

A minha orientadora Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde pela oportunidade concedida e pela confiança depositada em mim, também por servir de inspiração para este e para os próximos projetos.

A todos os colegas do Laboratório de pesquisa em imunologia (LAPI) por terem tido paciência e me ensinado todas as técnicas e metodologias necessárias para a produção deste texto

Por fim gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune que atinge cerca de 1% da população mundial. O desenvolvimento dos medicamentos inibidores do TNF- α na última década representou um grande avanço no tratamento das formas moderadas e severas da artrite reumatoide. O Etanercept é um medicamento que compete com o receptor do TNF- α pela ligação desta citocina. Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório do etanercept utilizando o modelo murino de inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar. Para isso foi realizada a contagem total de leucócitos no fluído da bolsa de ar utilizando-se contador celular automatizado (Auto Hematology Analyzer BC-2800 VET, henchen Mindray Bio-Medical electronic CO Ltda., Hamburger, Germany). A contagem diferencial celular foi realizada em esfregaços corados com May-grunwald-Giemsa em microscópio óptico comum. A exsudação foi avaliada pela quantificação de azul de Evans (25 mg/kg) administrado por via endovenosa e analisado no fluído da bolsa de ar por metodologia colorimétrica e em leitor de ELISA. As dosagens das atividades de MPO, ADA e da concentração de NO foram realizadas no fluído da bolsa de ar por metodologias colorimétricas. As citocinas também foram avaliadas no fluído da bolsa de ar por citometria de fluxo usando o kit comercial (Cytometric Bead Array CBA mouse Th1/Th2 Cytokine kit) e os resultados analisados utilizando o software FCAP array®. A fosforilação da p-65-NF-kB foi realizada no tecido da bolsa de ar com a metodologia de ELISA utilizando-se anticorpos monoclonais. A análise da apoptose em neutrófilos foi realizada no fluído da bolsa de ar por citometria de fluxo utilizando-se os seguintes marcadores: anticorpos anti-CD11-b marcados com PEcy7 e anti-LY-6G marcado com PE para separar a população de neutrófilos ativados, e anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 7-actinomicina (7-AAD) como marcadores de apoptose e necrose respectivamente. Todos os parâmetros inflamatórios foram avaliados 24h após a indução da inflamação na bolsa de ar. Em todos os experimentos utilizou-se como referência grupos de animais tratados com dexametasona e indometacina. A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico ANOVA, seguido de teste pos-hoc Newmann-Keuls. Para todas as análises foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$. O Etanercept foi capaz de reduzir a concentração leucocitária no fluído da bolsa de ar ($P < 0,01$) principalmente reduzindo a concentração de

neutrófilos ($P < 0,01$), e a exsudação ($P < 0,01$). Além disso, o etanercept inibiu a atividade das enzimas MPO ($P < 0,01$), ADA ($P < 0,01$) e as concentrações de NOx ($P < 0,01$), também reduziu as concentrações das citocinas IFN- γ ($P < 0,05$), TNF- α ($P < 0,01$) e IL-17 ($P < 0,05$), também reduziu os níveis de fosforilação do NF- κ B ($P < 0,05$). Por fim o etanercept apresentou um efeito indutor na apoptose em neutrófilos ($P < 0,05$). Os resultados deste estudo demonstraram que o etanercept apresentou atividade anti-inflamatória possivelmente pela redução da ativação da via do NF- κ B, além disso, seu efeito sobre os neutrófilos pode indicar um possível mecanismo pelo qual o tratamento com este medicamento possa apresentar benefícios logo no início da artrite-reumatoide assim como no tratamento de outras doenças inflamatórias onde estas células estejam envolvidas.

Palavras-chave: bolsa de ar, marcadores inflamatórios, apoptose.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is a chronic, autoimmune inflammatory disease affecting 1% of world's population. The development of the TNF- α inhibitors in the last decade represented a great advance in the treatment of the mild to severe forms of the rheumatoid arthritis. Etanercept is a drug that competes with the TNF- α receptor for the binding of this cytokine. This paper aimed to evaluate the anti-inflammatory effects of etanercept using the carrageenan induced air-pouch model in mice. To achieve this end the total leukocyte content was analyzed in the air-pouch fluid leakage through automated cell counter (Auto Hematology Analyzer BC-2800 VET, henchmen Mindray Bio-Medical electronic CO Ltda., Hamburger, Germany). The differential cell count was analyzed through observation of May-Grunwald-Giemsa colored smears in a common optic microscope. The exudate levels were evaluated through the injection of Evan's blue dye (25 mg/kg) through intravenous route and the air pouch fluid leakage was analyzed by colorimetric methodology in an EIE plate reader. The analyses of the MPO, ADA activities and NOx concentration were realized in the air-pouch fluid leakage using colorimetric assays. The cytokine concentrations were analyzed in the air-pouch fluid leakage using the commercial kit (Cytometric Bead Array CBA mouse Th1/Th2 Cytokine kit) and the data was analyzed using the FCAP array® software. The p-65-NF- κ B phosphorylation was analyzed in the tissue of the air-pouch by EIE methodology using monoclonal antibodies. The neutrophil apoptosis was realized in the air-pouch fluid leakage through flow cytometry using the following antibodies: anti-CD11-b-PEcy7, anti-Ly-6g-PE for the activated neutrophil gating and apoptosis and necrosis was analyzed through annexin V and 7-actinomycin respectively. All the inflammatory parameters were evaluated 24h after the induction of the inflammation in the air pouch. In all experiments groups of animals treated with dexamethasone and indomethacin were used as reference. The statistical analysis was realized by the ANOVA variation test followed by post-hoc Newmann-keuls. For all analyses values of $P < 0.05$ were considered significant. Etanercept was able to reduce the leukocyte concentration in the air pouch leakage ($P < 0.01$), mainly by the reduction of neutrophils ($P < 0.01$), and exudation ($P < 0.01$). Treatment with etanercept reduced MPO ($P < 0.01$) and ADA ($P < 0.01$) activities and NOx ($P < 0.01$) concentration, also reduced the concentration of IFN- γ ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.01$) and IL-17 ($P < 0.05$) and reduced

the NF- κ B phosphorylation levels ($P < 0.05$). Finally etanercept presented an apoptosis inducing effect in neutrophils ($P < 0.05$). The results of this study showed that etanercept presented anti-inflammatory activity possibly through the reduction of the activation of NF- κ B pathways, besides, it's effect on neutrophils may indicate a possible mechanism through which the treatment with this drug may present benefits in the beginning of rheumatoid arthritis as well in the treatment of other inflammatory diseases with the involvement of these cells.

Keywords: air-pouch, inflammatory biomarkers, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização do IFN- γ	33
Figura 2 – Via de sinalização da IL-6.	36
Figura 3 – Via de sinalização do TNF- α	39
Figura 4 – Via de sinalização da IL-17.	41
Figura 5 – Via de sinalização do NF- κ B.	47
Figura 6 – Efeito do etanercept (5 mg/kg) na indução da inflamação por Cg, sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares e na exsudação no modelo murino da bolsa de ar.	64
Figura 7 – Efeito do etanercept sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA).	65
Figura 8 – Efeito do etanercept sobre as concentrações de nitrato/nitrito:	66
Figura 9 – Efeito do etanercept sobre a resposta Th1, Th2 e Th17.	68
Figura 10 – Efeito do etanercept na fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- κ B)	69
Figura 11 – Efeitos do etanercept sobre a apoptose de neutrófilos.	71
Figura 12 – Resumo gráfico do programa experimental e resultados do trabalho.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-Actinomicina
ACPAs	Anticorpos anti proteínas citrulinadas
Act1	Ativador 1 do fator de transcrição nuclear kappa B
ADA	Adenosina deaminase
ADAM17	Proteína 17 contendo os domínios para desintegrina e metaloproteinase
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AR	Artrite reumatoide
ATP	Trifosfato de adenosina
BAFF	Fator ativador de células B
BCDF-II	Fator 2 de diferenciação de células B
BSF-2	Fator 2 estimulador de células B
CAMs	Moléculas de adesão celular
CCL	Ligantes de quimiocinas tipo C-C
CCR	Receptores para quimiocina tipo C-C
CD	Cluster de diferenciação
Cg	Carragenina
CHP	Complexo de histocompatibilidade principal
CIA	Artrite induzida pelo colágeno
cIAPs	Proteínas inibidoras da apoptose
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CXCL	Ligante de quimiocinas tipo C-X-C
CXCR	Receptor para quimiocinas tipo C-X-C
DAMPs	Fatores associados a dano
Dex	Dexametasona
DMARDs	Drogas anti-reumáticas modificadoras da doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Quinase controlada por sinalização extracelular
Et	Etanercept
FDA	Food and drug administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	Forkhead box p3
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICAM	Molécula de adesão intracelular

IFN- γ	Interferon gamma
IFN- γ R	Receptor para o inteferon gramma
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
ikB	Proteína inibitória kappa B
IKK	Proteína quinase kappa B alfa
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de IL-1
IL-6R	Receptor da interleucina-6
Ind	Indometacina
iNOs	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina 1
IRF-1	Fator regulador de interferon
JAK	Janus quinase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT β	Linfotoxina-beta
LT β R	Receptor para linfotoxina-beta
LXA4R	Receptor para lipoxina A4
MAC-1	Antígeno-1 associado a macrófagos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MMP	Metaloproteinase de matriz
MMR	Receptores de manose de macrófagos
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Proteína de diferenciação mieloide 88
NEMO	Modulador essencial do fator de transcrição nuclear kappa B
NET	Redes extracelulares de neutrófilos
NF-IL-6	Fator nuclear IL-6
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NIK	Quinase indutora do fator de transcrição nuclear kappa B
NLR	Receptores tipo NOD
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina
PI3K	Fosfoinositol-3-fosfato
PRM	Moléculas reconhecedoras de padrões

PSGL1	Glicoproteína ligante da P-selectina
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator de transcrição nuclear kappa B
RIP	Proteína serina/treonina quinase 1 de interação com o receptor
ROR- γ	Receptor órfão gamma relacionado a RAR
Sal	Solução salina (0,9%)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sIL-6R	Receptor da IL-6 solúvel
SOCS3	Supressor de sinalização de citocinas
STAT	Sinal de transdução e ativação de transcrição 1
TACE	Enzima conversora de TNF
TAK1	Quinase 1 associada ao fator de crescimento transformador beta
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
Th	Linfócitos T auxiliares
TLR	Receptores tipo Toll
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tr1	Células T regulatórias do tipo 1
TRADD	Proteína da via do domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral
TRAF	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Treg	Linfócitos T regulatórios
TRF	Fator substituto de células T
TRIF	Proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon beta
VCAM	Molécula de adesão vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1.	ETANERCEPT	24
1.2.	PROCESSO INFLAMATÓRIO	26
1.3.	POLIMORFONUCLEARES	27
1.4.	MONONUCLEARES	30
1.5.	CITOCINAS	32
1.5.1.	INTERFERON- γ	32
1.5.2.	INTERLEUCINA-6.....	34
1.5.3.	FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALFA.....	37
1.5.4.	INTERLEUCINA-17.....	40
1.5.5.	INTERLEUCINA-10.....	42
1.5.6.	INTERLEUCINAS-4 e 2.....	43
1.6.	ÓXIDO NÍTRICO:	44
1.7.	FATOR NUCLEAR KAPPA DE CÉLULAS B	45
1.8.	APOPTOSE	48
1.9.	MODELO EXPERIMENTAL	50
2.1.	OBJETIVO GERAL	53
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3.	MATERIAIS E METODOS	54
3.3.	ANIMAIS	55
3.4.	BOLSA DE AR	55
3.5.	CONCENTRAÇÃO DE EXSUDATO	56
3.6.	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	57
3.7.	ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	57
3.8.	ADENOSINA DEAMINASE	58

3.9.	QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO/NITRITO (NO _x)	58
3.10.	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS	59
3.11.	DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA p65 (p-p65-NF-Kb)	60
3.11.1.	Dosagem de proteínas totais	60
3.11.2.	Quantificação de p-p65-NF-κB.....	61
3.12.	APOPTOSE DE NEUTROFILOS	61
3.13.	ANALISE ESTATÍSTICA	62
3.	RESULTADOS	63
3.1.	EFEITOS DO ETANERCEPT NA CONCENTRAÇÃO DE ESXUDATO E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	63
3.2.	EFEITO DO ETANERCEPT SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS: MIELOPEROXIDASE (MPO) E ADENOSINA-DEAMINASE (ADA). 65	
3.3.	EFEITO DO ETANERCEPT SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO (NO _x)	66
3.4.	EFEITOS DO ETANERCEPT SOBRE A RESPOSTA Th1, Th2 e Th17. 67	
3.5.	EFEITOS DO ETANERCEPT NA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA P65 (p-p65-NFκB).	69
3.6.	EFEITOS DO ETANERCEPT NA APOPTOSE DE NEUTROFILOS.....	70
4.	DISCUSSÃO	72
5.	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	ANEXOS.....	90
	ANEXO I	92
	ANEXO II	95

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica autoimune caracterizada por inflamação sinovial, destruição progressiva da cartilagem e matriz óssea das articulações resultando em dor, redução da mobilidade, deformidades e perda de função levando a redução da qualidade de vida do paciente (KIKUTA e ISHII, 2013; MATCHAM et al., 2014).

É a doença autoimune mundialmente mais prevalente afetando de 0,5 a 2% da população, principalmente o sexo feminino. Fatores genéticos e ambientais são responsáveis pela suscetibilidade à doença (KORCZOWSKA, 2014).

Os neutrófilos, são células da imunidade inata e são a primeira linha de resposta contra microrganismos invasores, também são implicados na patogênese de diversas doenças como: diabetes tipo 2, doença pulmonar obstrutiva crônica e também na artrite reumatoide (DELIZ et al., 2012).

Estas células são importantes no início e no progresso da doença e quando ativadas aumentam a: 1) produção de espécies reativas de oxigênio, 2) expressão de receptores de alta afinidade para frações constantes de imunoglobulinas, e 3) expressão de redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Ainda os neutrófilos apresentam um tempo de sobrevivência maior no sítio inflamatório por inibição da apoptose. Vale ressaltar que a remoção dos corpos apoptóticos é essencial para a resolução da inflamação (WRIGHT et al., 2014).

Várias citocinas inflamatórias estão envolvidas na patogênese e na progressão da AR tais como IL-1, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-23, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) sendo este último um importante mediador responsável pela inflamação e a destruição articular. Desta forma, esta citocina se tornou alvo de estudo para a produção de novos medicamentos no tratamento da AR (TANAKA et al., 2014).

O desenvolvimento de agentes biológicos, particularmente os inibidores do TNF- α representou um grande avanço no tratamento da artrite reumatoide, (ROSENBLUM e AMITAL, 2011).

1.1. ETANERCEPT

Os primeiros medicamentos utilizados no tratamento da AR foram os anti-inflamatórios não esteroidais e os corticoides que apesar de promoverem a melhora sintomática da dor não são capazes de interferir na progressão da doença. Na década de 1980 houve o desenvolvimento de fármacos anti-reumáticos modificadoras da doença (DMARDs) que apresentam a capacidade de retardar o desenvolvimento da doença. Na última década surgiram os tratamentos biológicos, sendo que os anticorpos e as moléculas que interferem na função do TNF- α foram os primeiros a serem desenvolvidos (MOCSAI et al., 2014).

Embora atualmente existam diversos tipos de inibidores do TNF- α , o etanercept foi o primeiro inibidor do TNF- α aprovado pelo FDA (Food and drug administration) para o tratamento da AR em 1998 (VIVAR e VAN VOLLENHOVEN, 2014).

O etanercept é uma proteína de fusão obtida a partir da fusão de duas moléculas do receptor do TNF- α 2 (p75 TNFR2) conjugadas com a fração constante da imunoglobulina IgG1 humana (GABAY et al., 2014), possui uma meia vida de aproximadamente 95 horas (LEE et al., 2003),

Este medicamento possui afinidade maior pelo TNF que o seu receptor natural e por não se tratar de um anticorpo propriamente dito, possui como característica a propriedade de não fixar proteínas do sistema complemento, não causar citotoxicidade dependente de anticorpo ou apoptose em linfócitos T, como ocorre com outros inibidores do TNF- α (MAZZA et al., 2010).

Além de se ligar ao TNF α o etanercept também se liga a membros da família das linfotoxinas. Estudos demonstraram que o tratamento com este medicamento reduz o número de linfócitos B de memória no sangue periférico, o que não é observado com outros anti-TNFs. O tratamento com anti-TNF resulta em uma menor concentração

de células inflamatórias na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide. Este fato pode ser atribuído à diminuição da migração celular ou ao possível aumento da apoptose induzida por estes medicamentos (THALAYASINGAM e ISAACS, 2011). O papel do tratamento com anti-TNF na apoptose, citotoxicidade, redução do influxo ou o efluxo de células inflamatórias estão sendo estudados (TRACEY et al., 2008).

No Brasil o etanercept é utilizado para o tratamento de diversas doenças autoimunes dentre elas a artrite reumatoide. Este medicamento está disponível gratuitamente na rede básica de saúde (SUS) e é indicado para o tratamento da artrite reumatoide em casos moderados a graves não que não respondem ao tratamento convencional com drogas modificadoras (ANVISA, 2012), embora haja evidências que o tratamento com anti-TNFs no início da doença levam a maiores taxas de remissão clínicas, melhoras radiográficas e melhor progresso da doença do que se a terapia for iniciada tardiamente no curso da doença (EMERY et al., 2014).

O etanercept é utilizado em associação como metotrexato e é administrado por injeção subcutânea na dosagem de 25mg duas vezes por semana ou 50mg uma vez por semana (ANVISA, 2012).

Apesar de já terem o seu uso estabelecido e serem aprovados para o tratamento de diversas doenças, como artrite reumatoide, doença de Crohn, psoríase (DINARELLO, 2010), artrite idiopática juvenil, espondilite anquilosante e artrite psoriática (KUEK et al., 2007), estudos clínicos demonstraram que cerca de 30% dos pacientes em tratamento com anti-TNFs não respondem satisfatoriamente, havendo indícios de que uma das diferenças entre os respondedores e não respondedores está vinculada a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo (KOCZAN et al., 2008).

Com a iminente quebra da patente para os inibidores do TNF há um maior interesse na produção de medicamentos biossimilares (THALAYASINGAM e ISAACS, 2011; WILLRICH et al., 2014) sendo importante o conhecimento do mecanismo de ação dos fármacos, bem como das características destes medicamentos para que seja possível o desenvolvimento de novos medicamentos, bem como estabelecer

critérios eficientes de comparação entre os biossimilares e os medicamentos de referência (URBANO et al., 2014).

1.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório caracteriza-se por uma cadeia de eventos com o intuito de reparar tecidos em diversas situações desde cortes pequenos na pele até as agressões mais severas. Este processo consiste em uma cascata envolvendo a dilatação de arteríolas, aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e mais tardiamente a resolução da inflamação. Caso não haja a resolução do evento, o processo pode promover a disfunção orgânica e a perda de função do órgão (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). Os sinais clássicos da inflamação são: rubor, e calor causados pela vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo local, tumor, causado pelo extravasamento de proteínas plasmáticas e fluído no tecido, e dor causada por mediadores liberados por células endoteliais e leucócitos como prostaglandinas e bradicinina (XIAO et al., 2014).

A inflamação é um processo normal que ativa o sistema imunológico frente a uma agressão. A perpetuação do processo inflamatório pode resultar em desordens autoimunes, auto-inflamatórias, neurodegenerativas e câncer (DINARELLO, 2010). Para que a inflamação não ocorra espontaneamente há a necessidade da coordenação da expressão de vários genes. Em condições de estresse normalmente associado ao processo inflamatório há o aumento das concentrações de glicocorticoides, que por sua vez estimulam os macrófagos a ingerirem os corpos apoptóticos de células e a liberarem IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) a fim de diminuir a resposta inflamatória (NATHAN e DING, 2010). O processo inflamatório está envolvido em diversas doenças crônicas e agudas, dentre elas podemos citar isquemia do miocárdio, doença de Alzheimer, hipertensão arterial, câncer, doenças autoimunes, obesidade, doenças ósseas, dentre outras (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Uma das vias pelo qual o processo inflamatório se inicia é pelo reconhecimento dos fatores associados a patógenos e fatores associados

a danos (PAMPs e DAMPs) por meio da ativação de receptores, Toll-like (TLR) e NOD-like (NLR). A sinalização dos TLR é mediada pelas vias dependentes de ativação de genes tipo: gene 88 relacionado a diferenciação primária de células mieloides (MyD88) que ativa uma quinase denominada de quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) que se associa ao fator 6 associado ao receptor do TNF (TRAF6) formando um complexo que ao se associar a outra quinase denominada de quinase 1 associada ao fator de crescimento transformador beta (TAK1) promove a ativação do fator nuclear potencializador de cadeias leves kappa de células B (NF- κ B). Os NLR, são receptores intracelulares que ao se ligarem a PAMPs ou DAMPs promovem a ativação do complexo do inflamassoma que cliva a procaspase 1 em caspase 1 que converte a pró-IL-1 β e pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18 respectivamente (XIAO et al., 2014).

1.3. POLIMORFONUCLEARES

Os neutrófilos são células efectoras do sistema imune inato que foram descritas primeiramente por Elie Metchnikoff (KUMAR e SHARMA, 2010) e são consideradas a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores (DE LIZ et al., 2012).

A cascata de recrutamento de neutrófilos envolve diversas etapas sendo: a aproximação ao endotélio, o rolamento, a adesão, o rastejamento subendotelial e a transmigração para o sítio inflamatório (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

A liberação de mediadores inflamatórios resulta em modificações no endotélio, expressão de selectinas como a P-selectina e E-selectina que ao se ligarem aos seus respectivos ligantes celulares incluindo a glicoproteína ligante da P-selectina (PSGL1), promove a captura dos neutrófilos e inicia-se o processo de rolamento pelo endotélio. Durante este processo os neutrófilos entram em contato com citocinas presentes na superfície do endotélio, como o TNF- α e IL-1 β sendo assim ativado. Essa ativação promove alterações conformacionais na superfície dos neutrófilos que culminam com a expressão de integrinas sendo elas as integrinas β 2, CD11a e CD11b que se ligam a

moléculas de adesão celulares (CAMs). Para a transmigração os neutrófilos devem primeiramente passar pelo endotélio e depois pela membrana basal, processo que dura em torno de 20 minutos. A transmigração não ocorre necessariamente no mesmo local onde ocorre a adesão no endotélio, o neutrófilo rasteja pelo endotélio enquanto parte dele ainda está firmemente aderida ao endotélio isso é denominado de rastejamento sub-endotelial, esse processo é dependente da expressão da molécula de adesão intracelular (ICAM) e antígeno-1 associado a macrófagos (MAC-1) (KUMAR e SHARMA, 2010; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Os Neutrófilos migram seguindo uma hierarquia de sinais quimiotáticos, sendo eles divididos em sinais intermediários e sinais de ponto final. Na quimiotaxia os sinais intermediários são regulados pela via da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e os sinais de ponto final pelas vias de ativação das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), sendo que a p38 e a quinase controlada pela sinalização extracelular (ERK) agem como sinais de siga e pare durante esse processo (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Uma vez ativados e no local da inflamação, os neutrófilos apresentam tempo de vida maior em relação aos neutrófilos não ativados, isso é importante para que exerçam suas funções na eliminação dos patógenos e interajam com outras células do sistema imune. Os neutrófilos desempenham seu papel por diversos mecanismos, sendo eles a fagocitose, a liberação de grânulos contendo enzimas líticas, a produção de espécies reativas de oxigênio, a síntese e liberação de citocinas (IL-6, interferon-gamma (IFN- γ) e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF)), e das quimiocinas CXCL8, CCL20, além de proteínas como fator de ativação de células B (BAFF) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Além disso, os neutrófilos são produtores de moléculas reconhecedoras de padrões (PRMs) que são moléculas solúveis que se ligam a estruturas conservadas presentes em microrganismos, exercendo função análoga a de anticorpos (MANTOVANI et al., 2011).

A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos dos neutrófilos que catalisa a produção de ácido hipocloroso e possui

importante atividade microbicida (WINTERBOURN et al., 2006). Além disso, esta enzima quando presente no local da inflamação pode interagir com os receptores de manose de macrófagos (MMR) presente também nos monócitos, o que leva a liberação, por estas células, das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF potencializando assim o recrutamento de células para o local da inflamação (KUMAR e SHARMA, 2010).

Outro modo de ação dos neutrófilos é pela liberação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) que são formadas através da liberação dos conteúdos nucleares dos neutrófilos junto com enzimas como as serino proteases em um processo conhecido como NETose, e são capazes de capturar e eliminar os microrganismos invasores (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Os neutrófilos ainda atuam indiretamente no processo inflamatório pelo recrutamento de outras células da imunidade inata, como os monócitos, que são atraídos ao sítio da inflamação através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α , IL-8 e IL-17 (KUMAR e SHARMA, 2010). Os neutrófilos ainda podem agir como células apresentadoras de antígenos, caracterizando-se como uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Por fim os neutrófilos ainda possuem papel fundamental na resolução da inflamação pela expressão de substâncias denominadas de resolvinas como a lipoxina A4 que ao interagir com seu receptor, denominado receptor da lipoxina A4 (LXA4R) inibe o recrutamento de mais neutrófilos. Também são fontes de protectinas e do antagonista da citocina IL-1 β (IL-1RA). Além disso, os neutrófilos estimulam a própria fagocitose pelos monócitos (MANTOVANI et al., 2011).

Na artrite reumatoide, principalmente nos estágios iniciais da doença, há um aumento do número de neutrófilos na sinóvia, esses neutrófilos são mais propensos a o processo de NETose. Neste evento externalizam antígenos citrulinados como a vimentina, importantes para a patogênese e o desenvolvimento da doença. A vimentina por sua vez induz a NETose em neutrófilos. Além da vimentina, a IL-17A, o TNF- α também são estímulos para a NETose. Na remissão da AR ocorre a

diminuição da expressão de moléculas de adesão e consequentemente da quimiotaxia promovendo a redução da migração de neutrófilos para a sinóvia (KAPLAN, 2013).

1.4. MONONUCLEARES

Outro grupo celular de grande importância para a imunidade inata e o processo inflamatório são as células fagocíticas mononucleares, que são classificados em: monócitos circulantes, macrófagos residentes e células dendríticas e possuem papel importante na inflamação e na eliminação de patógenos, tendo ação direta na fagocitose e destruição dos agentes invasores, e indiretamente possuem papel na organização de cada fase do processo inflamatório (ITALIANI e BORASCHI, 2014).

Em camundongos há dois subtipos de monócitos, o subtipo CD11b Ly-6Chi que expressa o receptor tipo 2 para quimiocinas C-C (CCR2) e são classificados como pró-inflamatórios e o subtipo Ly-6Clow que expressa receptor tipo 1 para quimiocinas C-X-C (CX3CR1) e são exercem a função de sentinela. Já em humanos os macrófagos se dividem nos subtipos CD14++CD16- análogo aos macrófagos tipo ly-6Chi de camundongos, o subtipo CD14+CD16++ denominado de não clássico e no subtipo CD14++CD16+ denominado de intermediário (SHI e PAMER, 2011).

O recrutamento dos monócitos envolve o ligante CCL2 expresso por praticamente todas as células nucleadas que se ligam a o receptor CCR2 na membrana dos monócitos. Os receptores CCR1, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8 e CXCR2 também são importantes para a migração de monócitos (SHI e PAMER, 2011).

Apesar de diversas células como linfócitos T, linfócitos B e neutrófilos estarem envolvidos no início e progressão da AR, a destruição da cartilagem e a reabsorção óssea é causada principalmente devido a ativação exacerbada de osteoclastos. (KIKUTA e ISHII, 2013).

Os linfócitos são células mononucleares que possuem papel fundamental no reconhecimento de antígenos e na produção de anticorpos. Na AR ocorre um intenso infiltrado de linfócitos T na

membrana sinovial, sendo essas células consideradas importantes para o desenvolvimento da doença (SAKKAS et al., 2014).

A produção de anticorpos contra proteínas citrulinadas (APCAs) está presentes em dois terços dos pacientes com AR. Estes anticorpos são das classes IgA ou IgG e necessitam linfócitos T para a sua produção. A produção destes anticorpos também está relacionada a uma sequência de aminoácidos presentes nas posições 70-74 do HLA-DRB1 conhecida como epitopos compartilhado, pelo qual desencadeiam a ativação de linfócitos T iniciando uma resposta imune. Imunocomplexos formados pelos APCAs são capazes de estimular a produção de TNF- α por macrófagos via TLR-4 e sua presença está relacionada com menor resposta ao tratamento com anti-TNFs (KORCZOWSKA, 2014; SAKKAS et al., 2014).

Os linfócitos, quando presentes no tecido inflamado, são fonte da enzima adenosina desaminase (ADA) que está envolvida no metabolismo das purinas, e é responsável pela desaminação da adenosina em inosina e possui um papel importante no sistema imune (ZAKERI et al., 2012).

A adenosina é o produto da degradação do trifosfato de adenosina (ATP) intracelular pelas 5'-nucleotidase CD73 e do ATP extracelular pela apyrase CD39. A adenosina possui meia vida curta, cerca de 10 segundos, sendo rapidamente degradada pela enzima adenosina deaminase (ADA). São descritos quatro receptores para a adenosina presentes nas células do sistema imune, A1, A2A, A2B e A3 (BARLETTA et al., 2012).

A função da adenosina depende da célula alvo e do subtipo do receptor ativado. A ativação dos receptores do tipo A2A, A2B e A3 leva a redução da expressão de moléculas de adesão e redução da produção do ânion superóxido em neutrófilos, redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ IL-6, IL-12, em mastócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos enquanto a estimulação do receptor A1 leva o aumento da expressão de moléculas de adesão em neutrófilos, quimiotaxia e maturação de células dendríticas (ANTONIOLI et al., 2014).

A concentração de adenosina aumenta em tecidos onde há modificações metabólicas como ocorre no processo inflamatório, sendo este um inibidor natural na atividade das células imunes. Por outro lado o aumento persistente na formação e atividade da adenosina deaminase (ADA), responsável pela degradação da adenosina, estão relacionados com dano tecidual (ANTONIOLI et al., 2012).

Adenosina tem um papel importante na limitação do dano inflamatório aos tecidos do hospedeiro, há correlação entre a atividade da enzima ADA e a severidade da inflamação. A atividade da ADA está elevada em doenças como: artrite reumatoide e pancreatite. Os receptores A2a e A3 estão relacionados ao controle da resposta imune, sendo que o receptor A2a quando ativado reduz a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e reduz o dano tecidual causado por estresse oxidativo. O envolvimento do receptor A3 é relacionado com melhora da inflamação intestinal. Há interesse no desenvolvimento de terapias cujo alvo seja os receptores de adenosina ou a ADA para o tratamento da inflamação (ANTONIOLI et al., 2010).

1.5. CITOCINAS

As citocinas são proteínas solúveis com funções regulatórias que facilitam a comunicação intercelular nas respostas imunes e na hematopoese, possuem grande relevância na defesa do hospedeiro e homeostase tecidual embora sua produção exagerada promova o início e progressão de doenças agudas e crônicas (KANG et al., 2015).

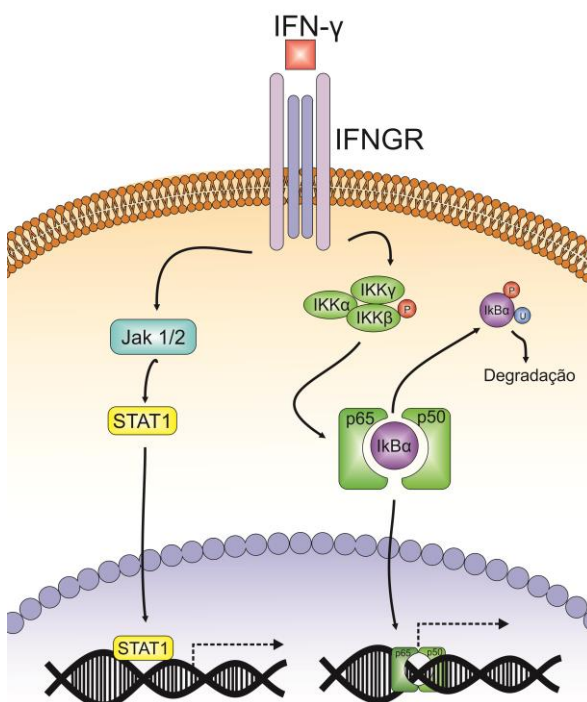
1.5.1. INTERFERON- γ

O interferon gamma (IFN- γ) é uma proteína constituída por 146 resíduos de aminoácidos e é o único membro descrito da família do IFN tipo II (FERREIRA et al., 2014). Esta citocina é produzida principalmente por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), linfócitos T citotóxicos (CD8+), e células natural killers, podendo também ser produzido por células apresentadoras de antígenos (APCs) durante a

resposta imune contra patógenos intracelulares como bactérias e vírus (DE BRUIN et al., 2014; FERREIRA et al., 2014).

O receptor do IFN- γ (IFN- γ R) é composto por dois domínios extracelulares e dois intracelulares que ativam as vias janus quinase (JAK) e do sinal de transdução e de ativação de transcrição 1 (STAT-1) (SCHURGERS et al., 2011). A via de sinalização do IFN- γ está demonstrada na Figura 1.

Figura 1 – Via de sinalização do IFN- γ .



A ativação do receptor do IFN- γ leva a ativação de mais de 200 genes via sinalização por Jak/STAT e NF- κ B, IFN- γ : Interferon-gamma; IFNGR: receptor para o interferon-gamma; I κ B: Proteína inibitória kappa B; IKK: proteína kinase kappa B alfa; Jak: Janus kinase; STAT: sinal de transdução e ativação de transcrição 1.

Fonte: elaborado pelo autor adaptado de (THAPA et al., 2011).

O IFN- γ é um potente ativador de macrófagos e neutrófilos, induzindo a apresentação de antígenos e a formação de espécies reativas de oxigênio. Promove também a expressão de moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1) no endotélio aumentando o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Também é capaz de induzir a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) em células que normalmente não o expressam podendo ser a base de doenças autoimunes (SCHURGERS et al., 2011).

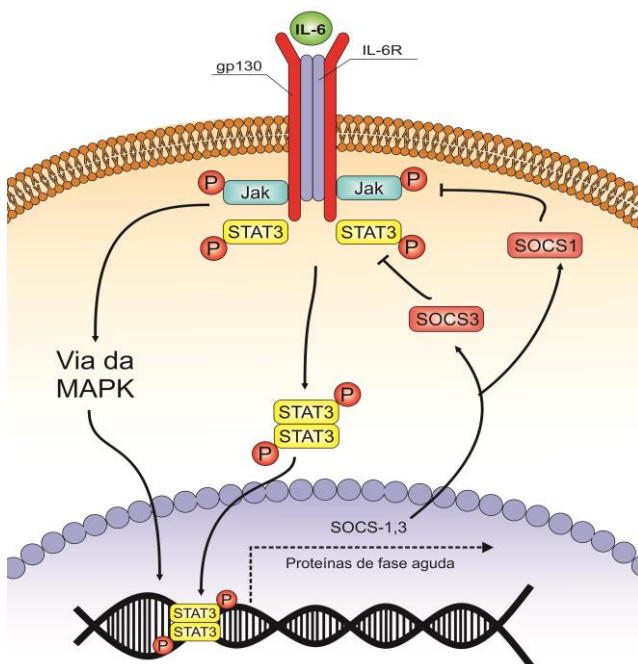
1.5.2. INTERLEUCINA-6

A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular de 26 kDa com atividades pleiotrópicas e sua desregulação e produção persistente é relacionada ao desenvolvimento da AR (YOSHIDA e TANAKA, 2014). Esta citocina é sintetizada por células do sistema imune inato como neutrófilos, monócitos e macrófagos após a estimulação dos receptores do tipo toll (TLR) (CALABRESE e ROSE-JOHN, 2014). Estímulos por TNF- α , IL-1 e a própria IL-6 promovem a expressão de vários fatores envolvidos na ativação do gene da IL-6 como o fator nuclear kappa B (NF-kB), o fator nuclear IL-6 (NF-IL6), o fator regulador de interferon 1 (IRF-1) (KANG et al., 2015).

Primeiramente foi observado que o estímulo antigênico induzia o crescimento e a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos, e que esse processo era mediado por linfócitos T. Também se viu que essa função dos linfócitos T pode ser substituída por fatores solúveis, esses fatores receberam diversos nomes de acordo com sua atividade como fator estimulante de células b-2 (BSF-2), fator substituto de células T (TRF), fator de diferenciação de células B-2 (BCDF-II). Após o DNA complementar ser clonado em 1986 percebeu-se que todas essas funções eram exercidas pela mesma molécula que foi denominada de IL-6 (HIRANO, 2014).

A IL-6 é uma proteína de hélice quadrupla constituída por 184 aminoácidos que exerce seu efeito via ativação do receptor da IL-6 (IL-

6R). O complexo IL-6-IL-6R se associa a proteína transmembrana gp130. A dimerização da gp130 ativa as janus kinase (JAK) que fosforilam cinco resíduos de tirosina presentes na gp130. O resíduo de tirosina proximal quando fosforilado estimula as vias da MAPK e PI3K. Os outros quatro resíduos, quando fosforilados, recrutam as STAT1 e STAT3 que se dimerizam e se dirigem ao núcleo da célula onde atuam como fatores de transcrição. A dimerização da gp130 promove a expressão de genes proliferativos, antiapoptóticos e de proteínas de fase aguda nas células alvo. Além disso a ativação de gp130-JAK-STAT promove o aumento da expressão do supressor de sinalização de citocinas (SOCS3) que atua como regulador negativo da sinalização da IL-6 (CALABRESE e ROSE-JOHN, 2014). A via de sinalização da IL-6 é demonstrada na Figura 2.

Figura 2 – Via de sinalização da IL-6.

A sinalização da IL-6 é capaz de ativar duas vias principais, STAT3 e MAPK, levando a indução de vários genes. A sinalização também induz SOCS1 e SOCS3 que atuam como inibidores da sinalização da IL-6. IL: Interleucina; Jak: Janus quinase; -SOCS: Supressor da sinalização de citocinas; STAT: Sinal de transdução e ativação de transcrição 1; Fonte: elaborado pelo autor adaptado de (KANG et al., 2015).

Embora o receptor IL-6R seja expresso por um número limitado de células como leucócitos e hepatócitos, a gp130 está presente em vários tipos celulares (YOSHIDA e TANAKA, 2014).

O receptor da IL-6 pode ser clivado pela metaloproteínase denominada de proteína 17 contendo os domínios para desintegrina e metaloproteínase (ADAM17) liberando assim a forma solúvel do receptor da IL-6 (sIL-6R). O complexo IL-6sIL-6R pode se ligar a

gp130 e ativar as vias de sinalização da IL-6 em células que originalmente não expressam o receptor IL-6R como células endoteliais e do músculo liso. Essa via é conhecida como trans-sinalização (CALABRESE e ROSE-JOHN, 2014).

Na AR a IL-6 ativa as células endoteliais que passam a produzir quimiocinas como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e moléculas de adesão, assim recrutando os monócitos para as articulações, induzindo a diferenciação em osteoclastos via ativação do ligante do receptor ativador de NF- κ B (RANKL). A ativação desta via está associada à osteoporose e a destruição óssea, além de aumentar a produção de metaloproteínas de matriz (MMPs) em sinoviócitos contribuindo para a destruição da cartilagem e articulação. As concentrações séricas de IL-6 correlacionam-se com a severidade da destruição articular (YOSHIDA e TANAKA, 2014; KANG et al., 2015).

1.5.3. FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALFA

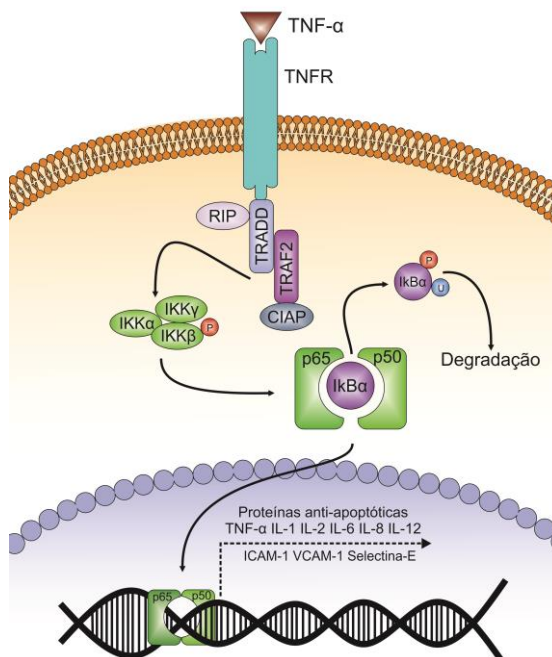
O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória da superfamília do fator de necrose tumoral, foi descrita pela primeira vez em 1962 quando recebeu o nome de fator necrotizante de tumor, devido à sua ação em células tumorais. Posteriormente foi renomeada como fator de necrose tumoral. Esta citocina foi clonada e teve sua sequência elucidada em 1984 (AGGARWAL, 2003).

O TNF é produzido por monócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos, além de queratinócitos e células dendríticas (MAZZA et al., 2010), embora fibroblastos, osteoblastos, mastócitos, eosinófilos, células epiteliais também possam ser fontes dessa citocina.

Os estímulos para a síntese do TNF- α são IL-1, endotoxinas bacterianas, o próprio TNF, fator de crescimento derivado de plaquetas, dentre outros. O TNF- α é sintetizado em sua forma precursora inativa contendo 212 aminoácidos. A enzima conversora de TNF (TACE) cliva o TNF- α ligado a membrana liberando a fração solúvel e biologicamente ativa. São descritos pelo menos 29 receptores diferentes da família dos receptores de TNF, sendo o receptor 1 do TNF (TNFR1) o mais estudado (MUKHOPADHYAY et al., 2006).

O TNF- α se liga no receptor TNFR1 promovendo o recrutamento da proteína da via do domínio de morte associada ao receptor de TNF (TRADD) que por sua vez recruta a proteína serina/treonina quinase 1 de interação com o receptor (RIP) e o fator associado ao receptor 2 do TNF (TRAF2) que por sua vez se liga a proteínas inibidoras da apoptose (cIAPs). O fator TRAF2 catalisa a ubiquitinação da RIP que promove o recrutamento do complexo composto pela proteína quinase I kappa B alfa (IKK1) e I kappa B beta (IKK2) e pela subunidade regulatória denominada modificador essencial do NF- κ B (NEMO/IKK) promovendo a fosforilação da IKK2 e ativação da via do NF- κ B, que estimula a produção de diversos mediadores inflamatórios como a molécula de adesão intracelular (ICAM-1), a molécula de adesão vascular (VCAM-1) e E-selectina que exercem importante função no recrutamento de células para o sítio inflamatório (XIAO et al., 2014). A via de sinalização do TNF- α é demonstrada na Figura 3.

Figura 3 – Via de sinalização do TNF- α .



A ligação do TNF ao seu receptor leva a degradação da proteína inibitória I κ B α . A migração de p65/p50 no núcleo resulta na transcrição de vários genes pró-inflamatórios. CIAP: Proteína inibitória da apoptose; ICAM: molécula de adesão intracelular; I κ B: Proteína inibitória kappa B; IKK: Proteína quinase kappa B alfa; IL: interleucina; RIP: Proteína serina/treonina quinase 1 de interação com o receptor; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; TNFR: Receptor para o fator de necrose tumoral alfa; TRADD: Proteína da via do domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral; TRAF: Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral; VCAM: Molécula de adesão vascular. Fonte: elaborado pelo autor adaptado de (XIAO et al., 2014).

Tendo o TNF- α papel central no processo inflamatório, e no dano tecidual decorrente do descontrole do mesmo, há um grande

interesse em se inibir essa citocina como medida de controle da inflamação presente em doenças de caráter inflamatório crônico. O desenvolvimento de inibidores do TNF- α na última década representou um grande avanço no tratamento da artrite reumatoide (ROSENBLUM e AMITAL, 2011).

1.5.4. INTERLEUCINA-17

A família da citocina IL-17^a também apresenta grande importância no processo inflamatório e é representada pelas citocinas IL-17A também conhecida como CTLA-8, IL-17B, IL-17C, IL-17D e a IL-17E também conhecida como IL-25 (SHABGAH et al., 2014).

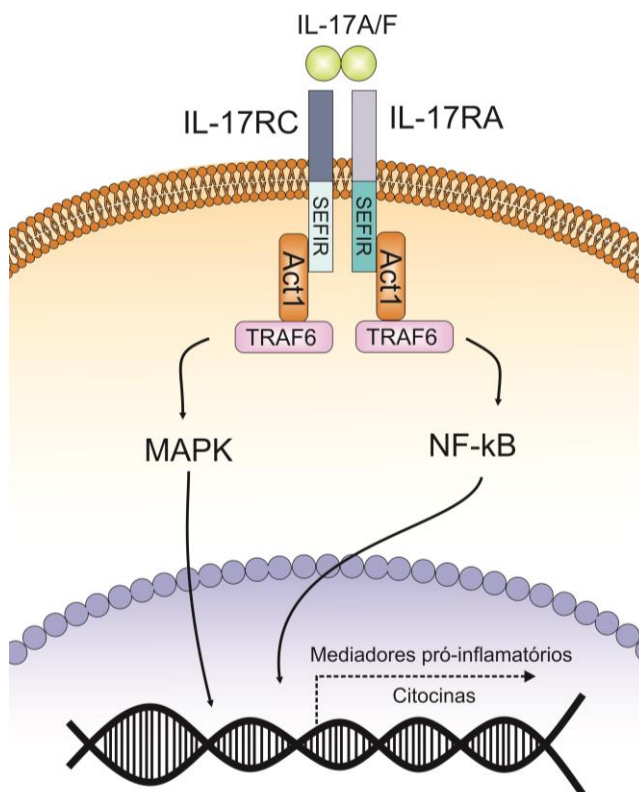
Em 2003 foi demonstrado que os linfócitos T auxiliares (CD4+) ao serem estimuladas por IL-23 expressavam perfis de citocinas diferentes dos clássicos Th1 e Th2. Estas células expressavam principalmente a citocina IL-17 e por meio dela regulavam a inflamação e a resposta imune, sendo chamadas de linfócitos Th-17 (LYNDE et al., 2014). O papel proeminente destas células na inflamação e autoimunidade foi estabelecido ao se demonstrar que as células Th17 produtoras de IL-17 são suficientes para se transferir, entre camundongos, encefalomielite experimental autoimune, modelo animal de esclerose múltipla (YANG et al., 2014).

Tanto o TGF- β quanto a IL-6 são fundamentais para a geração das células Th-17, sendo que a IL-23 é necessária para a manutenção deste fenótipo. Os linfócitos Th17 produzem as citocinas IL-17A a F, IL-21, IL-22, IL-9, IL-10, IFN- γ e GM-CSF sendo a IL-17A a principal efetora destas células. Além disso, as Th-17 podem ser induzidas por IL-6, IL-1 β , IL-23 independentes de TGF- β , quando induzidas por essas vias as células possuem um perfil mais patogênico (BEDOYA et al., 2013).

Vários tipos celulares são capazes de sintetizar IL-17, como os linfócitos $\gamma\delta$, natural killers, eosinófilos (SHABGAH et al., 2014). A produção de IL-17 por neutrófilos ainda não está bem esclarecida (LYNDE et al., 2014).

Vários tipos celulares são alvo da IL-17 como fibroblastos, macrófagos, condrócitos, células do epitélio intestinal, ao se ligar nos seus receptores promove o aumento da síntese e liberação de citocinas como TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-21, IL-23, GM-CSF, e quimiocinas pelas células alvo através das vias da MAPK e NF- κ B, desencadeando assim o recrutamento de granulócitos especialmente neutrófilos ativando o processo inflamatório agudo (SHABGAH et al., 2014). A via de sinalização da IL-17 está demonstrada na Figura 4.

Figura 4 – Via de sinalização da IL-17.



A ligação da IL-17 ao seu receptor leva a ativação das vias da MAPK e do NF- κ B resultando na transcrição de diversos mediadores pró-inflamatórios e citocinas. Act1: ativador 1 do NF- κ B; IL-17: Interleucina-17; IL-17R: Receptor para interleucina-17; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; NF- κ B:

Fator de transcrição nuclear kappa B; TRAF: Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral. Fonte: elaborado pelo autor adaptado de (CHANG e DONG, 2011).

As células Th-17 estão relacionadas com várias desordens autoimunes como a artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren, psoríase, diabetes tipo 1, asma, câncer, entre outros (SINGH et al., 2014).

É relatado altas concentrações de IL-17 na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide, estas concentrações estão relacionadas com a inflamação e erosão óssea por meio da indução da síntese de TNF- α , IL-1 β e IL-6 a partir de sinoviócitos e macrófagos, além de estimular a produção de mieloproteínas de matriz que promovem a degradação da matriz extracelular e a reabsorção óssea. Na artrite reumatoide, a IL-17 também promove o recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e linfócitos para a sinóvia por meio da ativação de moléculas de adesão e da produção de quimiocinas (SHABGAH et al., 2014), além de promover o aumento da produção de NO na cartilagem sinovial, o que possui papel importante na inflamação associada a artrite reumatoide (BEDOYA et al., 2013).

A desregulação da produção de IL-17 promove a hiperplasia dos tecidos sinoviais, dano articular pela produção de metaloproteínas e ativação de osteoclastos. Camundongos deficientes em IL-17 e IL-23 são resistentes ao desenvolvimento da artrite induzida por colágeno (CIA), reforçando o importante papel desta citocina na AR (PINEDA et al., 2014).

O bloqueio da IL-17 juntamente com o bloqueio de TNF- α possui um papel sinérgico na redução da produção de IL-6, degradação óssea e do colágeno na AR. Portanto há o interesse em se controlar a expressão da IL-17 como medida de controle dos processos inflamatórios nas doenças autoimunes (SINGH et al., 2014).

1.5.5. INTERLEUCINA-10

A IL-10 é um homodímero de 37 kDa e foi descrita primeiramente como uma citocina capaz de inibir a expressão de IFN- γ em células Th1 (HEO et al., 2010). É produzida por vários tipos celulares como células Th2, células T regulatórias (Treg), células T regulatórias do tipo 1 (Tr1) caracterizadas por expressarem CD4 e não expressar Foxp3 e serem produtoras de IL-10, células T auxiliares 3 (Th3), células NK, Células B, macrófagos e células dendríticas (SANJABI et al., 2009).

A transcrição de IL-10 é induzida pela ativação dos receptores TLR através de moléculas adaptadoras como a proteína de diferenciação mielóide 88 (Myd88) e a proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon-beta (TRIF) com subsequente ativação das vias do NFkB, MAPKs, ERK, e p38, promovendo a transcrição de IL-10. Ao contrario do que ocorre nas citocinas pró-inflamatórias, a transcrição de IL-10 ocorre apenas pelo homodímero p50 do NFkB (KWILASZ et al., 2014).

O receptor da IL-10 é um heterodímero composto pela subunidade alfa do receptor da IL-10 (IL-10R α), presente apenas nas células do sistema imune inato e adaptativo e exclusivo da IL-10, e a subunidade beta do receptor da IL-10 (IL-10R β) expresso ubiquamente e compartilhado com a IL-22 (SANJABI et al., 2009).

A ativação do receptor da IL-10 promove a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, a liberação de moléculas anti-inflamatórias como o IL-1Ra e receptores solúveis de TNF (KWILASZ et al., 2014). Este receptor ainda é capaz de regular negativamente a expressão de receptor órfão gamma relacionado a RAR (ROR γ) e positivamente o fator de transcrição forkhead box p3 (FOXP3) em humanos, reduzindo assim o número de células Th17 e aumentando o número de células Treg sendo uma potente citocina anti-inflamatória (HEO et al., 2010).

1.5.6. INTERLEUCINAS-4 e 2

A IL-4 é uma citocinas secretada por células dendríticas, mastócitos, basófilos e eosinófilos (BAO e CAO, 2014), é capaz de

inibir a produção da IL-17 em modelos animais de artrite induzida pelo colágeno podendo possuir papel protetor nas fases iniciais da doença além de reduzir o dano ósseo neste modelo (SARKAR et al., 2009).

O papel da IL-4 na artrite reumatoide é desconhecido. Em modelos animais esta é capaz de proteger a matriz óssea e a cartilagem da erosão, além de induzir a síntese de colágeno, podendo assim promover o reparo tecidual (PAVLOVIC et al., 2014).

A IL-2 foi inicialmente caracterizada pela sua potente atividade como fator de crescimento de células T (BAYER et al., 2013), posteriormente implicada como fator importante para a diferenciação das células Treg, para a citotoxicidade mediada por células natural killers (BAO e CAO, 2014). É produzida por células T auxiliares CD4+ e por células T citotóxicas CD8+ nos tecidos linfoides secundários (SMIGIEL et al., 2014).

O receptor da IL-2, o IL-2R consiste das subunidades IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ c (CD32). A subunidade CD25 possui alta afinidade para IL-2 e apenas possui a função de capturar a IL-2 para facilitar a sua ligação as outras subunidades. Estas por meio de seus domínios intracitoplasmáticos iniciam as vias da sinalização da JAK, STAT5, PI3K e MAPK, modulando assim o crescimento celular, morte e função imune das células alvo (BAYER et al., 2013).

A IL-2 é importante para a prevenção do desenvolvimento de doenças autoimunes sistêmicas possuindo importante papel na maturação das células Treg (MAHMUD et al., 2013). Esta citocina controla predominantemente a manutenção de um subtipo específico de Treg, denominadas Treg centrais, que estão localizadas nas zonas de células T nos tecidos linfoides secundários, nesta localização, as células T reg podem receber IL-2 produzidas por células T ativadas de maneira parárcina e possuem a função de inibir APCs. Outro subtipo de Treg, as Treg efetoras, é independente da IL-2, são encontradas em tecidos não linfoides e exercem sua ação via secreção de IL-10 (SMIGIEL et al., 2014).

1.6. ÓXIDO NÍTRICO:

Outra molécula expressa em grandes concentrações durante o processo inflamatório é o óxido nítrico (NO), esta molécula atua no sistema nervoso central como neurotransmissor. No endotélio o NO possui ação reguladora do tônus vascular sendo assim implicado na manutenção da pressão arterial (TRIPATHI et al., 2007).

O NO é sintetizado a partir da arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a qual possui 3 isoformas, a NOS1, presente nos neurônios, NOS3 endotelial que são dependentes de cálcio e são expressas constitutivamente e a NOS2, também conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que é independente de cálcio e é expressa em macrófagos. Esta possui como função a morte de patógenos invasores, modular o desenvolvimento de células T e a produção de citocinas (LUIKING et al., 2012). Além disso, o NO quando presente em baixas concentrações promove a sobrevivência e a proliferação celular. Já quando presente em altas concentrações o NO está relacionado com o aumento da apoptose (LONKAR e DEDON, 2011).

Paradoxalmente a presença de NO está relacionada à inibição das selectinas E e P diminuindo o recrutamento celular para os sítios inflamatórios (TRIPATHI et al., 2007).

1.7. FATOR NUCLEAR KAPPA DE CÉLULAS B

O NF- κ B foi primeiramente descrito em 1986 em linfócitos B ativados pela sua propriedade de interação com a sequência potencializadora do gene da cadeia leve da imunoglobulina k (GASPARINI et al., 2014).

O reconhecimento de uma variedade de estímulos, como antígenos virais, citocinas e fatores de crescimento promovem a ativação do NF- κ B e a subsequente produção de citocinas inflamatórias, estas por sua vez também podem induzir a ativação do NF- κ B ampliando assim a resposta inflamatória (NGUYEN et al., 2014).

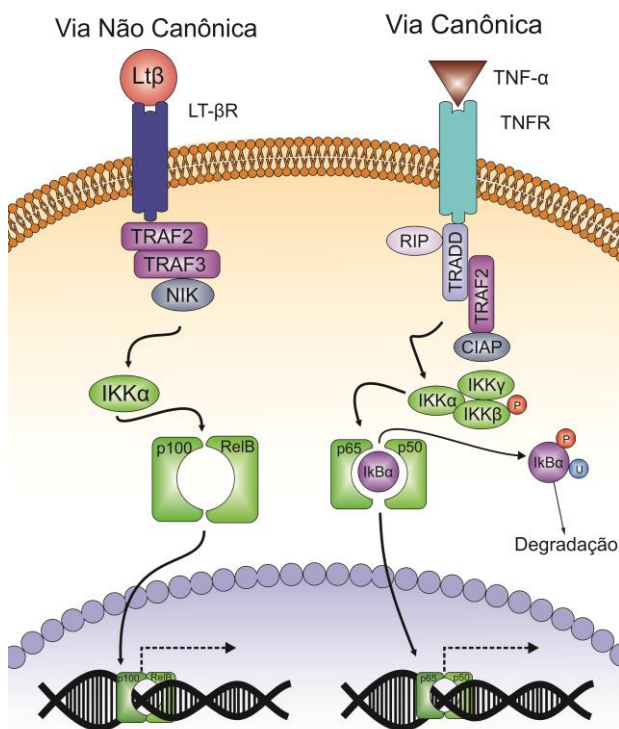
A família do NF- κ B compreende 5 proteínas relacionadas, a p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) e a p52 (NF- κ B2) que interagem para formar dímeros com distintas funções regulatórias de genes (GERONDAKIS et al., 2014).

No estado basal, os dímeros do NF- κ B estão ligados a proteínas inibitórias, I κ B as quais o sequestram mantendo-o no citoplasma celular (SALLES et al., 2014).

Duas principais vias da ativação do NF- κ B a via canônica e a via não canônica são descritas.

A via canônica que é induzida pela maioria dos estímulos fisiológicos promovendo a ativação do complexo IKK, (IKK α , β , γ e a proteína inibitória do NF- κ B). A I κ B α é fosforilada de maneira dependente de IKK β e γ e passa a ser alvo de ubiquitinação e posterior degradação proteossômica liberando assim o complexo p50-p65 para se translocar ao núcleo e ligar-se em seus sítios alvo. Já a via não canônica é induzida por citocinas da família do TNF como o ligante CD40 (CD40L), o fator de ativação de células B (BAFF) e linfotoxina-beta. Essa via envolve a fosforilação mediada pela IKK α da proteína p100 que se encontra associada com um dos heterodímeros da família do fator de transcrição NF- κ B (RelB) promovendo o processamento parcial da p100 formando assim o complexo p52-RelB ativo (OECKINGHAUS et al., 2011). A via de sinalização do NF- κ B está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 – Via de sinalização do NF- κ B.



Em condições de repouso os dímeros do NF- κ B estão ligados a proteína inibitória I κ B que sequestra estes dímeros no citoplasma. A ativação das quinases IKK fosforila a I κ B marcando-a para ubiquitinação e posterior degradação proteossômica, liberando assim os dímeros do NF- κ B que podem se translocar ao núcleo. A via de ativação do NF- κ B normalmente é descrita em duas vias, a canônica iniciada pela maioria dos estímulos fisiológicos e a via não canônica iniciada por citocinas da família do TNF- α e é independente de IKK- γ . Lt β : Linfotoxina-beta; LT- β R: receptor da linfotoxina-beta; TRAF: Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral; NIK: kinase indutora de NF-

kB; IKK: Proteína kinase kappa B; TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa; TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral; RIP: Proteína serina/reonina quinase 1 de integração com o receptor; TRADD: Proteína da via do domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral; CIAP: Proteínas inibidoras da apoptose.

Fonte: elaborado pelo autor adaptado de (OECKINGHAUS et al., 2011).

Os sítios de ligação do NF-kB foram identificados nos promotores de genes que codificam as citocinas inflamatórias, quimiocinas, complexo de histocompatibilidade principal, moléculas de adesão, e fatores de crescimento e de reguladores da apoptose (NGUYEN et al., 2014), sendo assim um importante regulador da resposta imune. Além disso, a sua desregulação é observada em diversas doenças autoimunes inclusive na artrite reumatoide (TANAKA et al., 2014).

1.8. APOPTOSE

Apoptose é um termo introduzido em 1972 para distinguir um modelo de morte celular com morfologia característica e processos endógenos aparentemente regulados (WYLLIE, 2010). É descrita como a morte celular programada possui como características principais as alterações mitocondriais promovendo o colapso no gradiente eletroquímico transmembrana e a liberação de citocromo C no citoplasma, ativação das caspases, condensação da cromatina, ativação de endonucleases, segregação e posterior fragmentação do núcleo e a formação de protrusões citoplasmáticas associadas a apoptose (WLODKOWIC et al., 2012).

A apoptose é responsável por diversos processos biológicos como, por exemplo: renovação celular, maturação do sistema imune, desenvolvimento embrionário e cerebral. A apoptose pode ser iniciada por duas vias, a via extrínseca, via da ativação da caspase 8 ou via do receptor de morte, e a via intrínseca ou mitocondrial, ambas convergem para a ativação de um zimogênio, a caspase-3 que por sua vez ativa as outras caspases da via da apoptose sendo (caspases 2, 8, 9 e 10, classificadas como iniciadoras, as caspases 3, 6 e 7, classificadas como

executoras e as caspases 1, 4 e 5 classificadas como inflamatórias) (MARTINEZ et al., 2010).

As células viáveis apresentam simetria em sua membrana plasmática, com a presença de resíduos de fosfatidilcolina na face externa e de resíduos de fosfatidilserina na face interna da membrana. Quando o processo de apoptose se inicia ocorre a externalização dos resíduos de fosfatidilserina, este fenômeno, em condições normais, serve como marcador para que a célula seja fagocitada (WLODKOWIC et al., 2012).

A anexina V possui a propriedade de se ligar aos resíduos de fosfatidilserina quando estes estão expostos na face externa da membrana plasmática. Devido a essa característica é utilizada em técnicas citométrias, junto com marcadores de viabilidade celular como o iodeto de propídeo ou a 7-aminoactinomicina D (7-AAD), como marcador para detectar células em processo de apoptose (DEMCHENKO, 2012).

Este método apresenta algumas desvantagens conhecidas, nas fases finais da apoptose, as células podem se mostrar positivas tanto para marcação com anexina V quanto para o 7-AAD. Ainda processos de extração podem promover a exposição dos resíduos de fosfatidilserina sem que as células estejam realmente em processo de apoptose. Por fim os macrófagos ao fagocitar os corpos apoptóticos podem apresentar-se positivos para a marcação com anexina V podendo assim apresentar resultados falso positivos quando este método é utilizado para detecção da apoptose (DEMCHENKO, 2012; WLODKOWIC et al., 2012).

O TNF- α pode tanto induzir quanto inibir a apoptose na célula alvo. A ligação do TNF- α a seus receptores de superfície, ativa a via do fator de transcrição nuclear NF- κ B que induz a transcrição de proteínas envolvidas na inflamação e inibição da apoptose (AVRAMIDIS et al., 2010). O TNF- α induz a ativação da NOS2, liberando grandes quantidades de NO, que por sua vez é capaz de iniciar o processo apoptótico via caspase-8 (INGARAMO et al., 2011).

A apoptose celular ainda possui um potencial imunogênico e pró-inflamatório em doenças crônicas e autoimunes como a AR,

antígenos presentes nos corpos apoptóticos, ao serem fagocitados por células dendríticas podem ser apresentados a linfócitos T auto reativos via CHP de classe 1 promovendo a produção de citocinas pró inflamatórias (CITRO et al., 2014).

Os antagonistas do TNF- α podem ter um efeito ambíguo, bloqueado ou induzindo a apoptose (TRACEY et al., 2008), a proporção entre os receptores TNFRI e TNFRII, junto com outros fatores, parece determinar se a célula exposta ao TNF- α sofrerá apoptose ou não (SZALAY et al., 2011).

Há poucos estudos investigando os efeitos de agentes inibidores de TNF- α e apoptose (TATLICKAN et al., 2010; SZALAY et al., 2011), sendo que há uma demanda por estudos relacionando mecanismos pró apoptóticos de agentes inibidores de TNF- α no tratamento de artrite reumatoide e outras doenças autoimunes (URBANO et al., 2014).

1.9. MODELO EXPERIMENTAL

Neste trabalho utilizamos o modelo da bolsa de ar em camundongos como descrito por (BENINCÁ et al., 2007) e (VIGIL et al., 2008) por ser uma técnica estabelecida e padronizada para o estudo dos mecanismos de ação farmacológicos e imunológicos de fármacos e biomateriais, para avaliar os efeitos do etanercept sobre marcadores pró-inflamatórios assim como os efeitos na apoptose de neutrófilos.

A bolsa de ar é um dos métodos mais adequados para se estudar a inflamação e para a triagem de fármacos com efeitos anti-inflamatórios (JAIN e PARMAR, 2011), este modelo experimental permite estudar propriedades farmacológicas, imunológicas e mecanismos de ação de fármacos e biomateriais (VANDOOREN et al., 2013), além de ser um modelo confiável para análise da migração celular (MURATA et al., 2014) e mediadores pró-inflamatórios.

Depois de 6 dias de administração de ar s.c. no dorso dos camundongos, ocorre a formação de uma fina camada recobrendo a cavidade constituída de fibroblastos e macrófagos que se assemelha a cavidade sinovial (ELLIS et al., 2000).

A administração de um agente flogístico como a carragenina nesta cavidade promove uma resposta inflamatória que mimetiza a inflamação que ocorre na articulação humana na artrite reumatoide (ELLIS et al., 2000).

A Carragenina é um polissacarídeo sulfatado obtido de algas marinhas vermelhas. Duas vias de ativação celular pela carragenina são descritas, ambas induzindo a inflamação, a via do receptor tipo toll 4-proteína 10 linfoma/leucemia de células B (TLR4-Bcl10) e outra via das espécies reativas do oxigênio, ambas as vias convergem para a via do IKK induzindo a translocação de NF- κ B levando assim ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias. O tratamento de animais com carragenina também promove o aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) contribuindo também para a indução da inflamação (BHATTACHARYYA et al., 2008).

No exsudato obtido da bolsa de ar pode-se verificar o extravasamento de proteínas, a expressão e atividade de enzimas relacionadas com o processo inflamatório além da análise dos perfis de citocinas pró-inflamatórias, sendo também um modelo útil para avaliar a migração leucocitária (MURATA et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do etanercept administrado sistemicamente na inflamação induzida pela carragenina, no modelo de bolsa de ar, em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação do etanercept sobre a migração de leucócitos e exsudação.
- Investigar a ação do etanercept sobre as atividades das enzimas mieloperoxidase, adenosina-deaminase, nas concentrações de nitrato/nitrito.
- Investigar a ação do etanercept sobre as respostas Th1, Th2 e Th17.
- Avaliar a ação do etanercept sobre a fosforilação da p65-NF-kB.
- Avaliar a ação do etanercept sobre a apoptose e necrose de neutrófilos.

3. MATERIAIS E METODOS

3.3. ANIMAIS

Neste protocolo experimental foram utilizados camundongos albinos swiss pesando entre 18 e 25 gramas. Estes animais foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$ e humidade de 56-60% com períodos de claro e escuro alternando a cada 12 horas com alimentação e água ad libitum. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética para a pesquisa em animais da Universidade Federal de Santa Catarina sob o protocolo PP00757.

3.4. BOLSA DE AR

Neste protocolo experimental diferentes grupos de animais foram anestesiados com associação de quetamina (75 mg/Kg) e xilasina (15 mg/kg) antes de receberem uma injeção de 1,5 mL de ar estéril no dorso por dia durante 3 dias alternados para formação da bolsa de ar em cada animal.

No sexto dia os animais depois de anestesiados receberam uma dose de 0.5mL de carragenina 1% via subcutânea (s.c) na bolsa de ar e após 24 h os animais foram submetidos a morte indolor assistida com uma overdose de ketamina (225 mg/kg) e xilasina (45 mg/kg) (BENINCÁ et al., 2007; VIGIL et al., 2008). Os animais foram fixados em uma mesa cirúrgica e uma incisão foi realizada na pele dorsal para perfuração da bolsa de ar. A cavidade da bolsa de ar foi então lavada com 1 mL de solução tampão de salina (PBS pH 7.6), contendo NaCl (130 mM), Na_2PO_4 (5 mM) e KH_2PO_4 (1 mM) e heparina (20 IU/mL) diluídos em água destilada). O número de leucócitos, a concentração de exsudato, a atividade de mieloperoxidase, adenosina deaminase, as concentrações de nitrato/nitrito, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, e fosforilação de p-65-NF-kB assim como a apoptose de neutrófilos foram avaliadas 24 h após a administração de carragenina. Em paralelo, um grupo de animais foi tratado previamente (0,5 h) da administração da carragenina por via intra peritoneal (i.p.) com

fármacos anti-inflamatórios de referência, dexametasona na dose de 0,5 mg/kg como representante dos anti-inflamatórios esteroidais e a indometacina na dose de 5 mg/kg representando os fármacos não esteroidais.

Para determinar a dose do etanercept a ser usada nos experimentos foi realizada uma curva dose-resposta. Diferentes grupos de animais foram tratados 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina com diferentes doses do etanercept (1, 2,5 e 5 mg/kg) e as concentrações de exsudato e de leucócitos foram analisadas 24 h após a injeção de carragenina. Para os próximos protocolos a menor dose capaz de reduzir o influxo de leucócitos e/ou as concentrações de exsudato foram utilizadas para avaliar os efeitos do etanercept sob a atividade de mieloperoxidase, adenosina deaminase, as concentrações de nitrato/nitrito, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, de fosforilação de p-65-NF-kB, e a apoptose de neutrófilos.

Em paralelo um grupo de animais recebeu 0,1 mL de solução salina (0,9%) estéril administrada por via i.p. Este grupo foi denominado de controle negativo. Outro grupo de animais recebeu apenas a administração de carragenina, 0,5 mL, s.c., este grupo foi denominado de controle positivo. Os mesmos parâmetros inflamatórios foram analisados após 24 h.

3.5. CONCENTRAÇÃO DE EXSUDATO

Para a avaliação da exsudação os animais receberam uma dose do corante azul de Evans (25 mg/kg) por via endovenosa (e.v.) utilizando-se a veia gengival 10 minutos antes da indução da inflamação pela carragenina.

Os animais então foram submetidos a morte indolor assistida por uma overdose de ketamina (225 mg/kg) e xilasina (45 mg/kg).

Uma amostra de 200 μ L do fluído obtido a partir da lavagem da bolsa de ar foi utilizada para determinar as concentrações de exsudato medindo a concentração de corante de azul de Evans. A análise foi realizada utilizando-se método colorimétrico em uma leitora de

enzimaimunoensaio (ELISA) (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorbância lida no comprimento de onda de 600 nm.

As absorbâncias foram comparadas por interpolação utilizando-se uma curva com concentrações conhecidas do corante azul de Evans (0,01 a 50 µg/L) como descrito por Benincá et al. (2007) e Vigil et al. (2008) e os resultados foram expressos em µg/mL.

3.6. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

A contagem total de leucócitos foi realizada no fluído obtido da cavidade da bolsa de ar utilizando-se um contador veterinário para células automatizado calibrado para camundongos (Auto Hematology Analyzer BC-2800 VET, henchen Mindray Bio-Medical electronic CO Ltda., Hamburger, Germany) Os resultados foram expressos em número de células x 10⁶/mL.

A contagem diferencial celular foi realizada por observação de um esfregaço corado com May-grunwald-Giemsa em um microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos em número de células x 10⁶/mL.

3.7. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada no fluído da cavidade da bolsa de ar utilizando-se a metodologia descrita por (RAO et al., 1993). Para a extração da MPO misturou-se 100 µL do fluído obtido da bolsa de ar com 100 µL de brometo de Hexadecyltrimetil-amônio (HTAB), 0.5% com posterior sonificação por 10 segundos e subsequente processo de congelamento e descongelamento em banho de gelo por 3 vezes.

A amostra foi centrifugada a 40000 g por 15 minutos a 4^o C e o sobrenadante obtido foi utilizado para a próxima etapa.

Desta forma, 40 µL do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de ELISA e 360 µL de solução tampão (0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,0005% H₂O₂) foi adicionado a reação. Uma solução de azida de sódio a 1% foi adicionada para o término da reação. Essa análise foi avaliada colorimetricamente utilizando uma leitora de ELISA

(Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorvância lida no comprimento de onda de 450 nm.

As absorvâncias das amostras desconhecidas foram comparadas por interpolação utilizando-se uma curva com concentrações conhecidas de MPO obtida de neutrófilos humanos (Sigma: M9088, St, Lis, MO, USA) (0,7 a 140 mU/mL) e os resultados foram expressos em mU/mL.

3.8. ADENOSINA DEAMINASE

Uma amostra de 20 µL do fluído da cavidade da bolsa de ar foi utilizada para a determinação da atividade de ADA usando metodologia descrita por (GIUSTI e GALANTI, 1984). Desta forma 500 µL de tampão fosfato ((NaH₂PO₄.H₂O (35 mM), NaH₂PO₄.12H₂O (15 mM) e adenosina (0,5 mM) pH 6,5)) foi adicionada a amostra de lavado e incubada por 1 h a 37° C. A seguir 1 mL de solução de fenol (1 mM) e de nitroprussiato de sódio (0,17 mM) foi adicionada a reação e 1000 µL de solução tampão NaOCl (11 mM) foi incluída na mistura. A análise foi realizada por metodologia colorimétrica utilizando uma leitora de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorvância lida no comprimento de onda de 630 nm.

As absorvâncias das amostras desconhecidas foram comparadas por interpolação utilizando-se uma curva com concentrações conhecidas de ADA (10 a 50 U/L) e os resultados foram expressos em U/L.

3.9. QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO/NITRITO (NO_x)

As concentrações de nitrato/nitrito foram quantificadas de acordo com o método descrito por (GREEN et al., 1982). Primeiramente o lavado da cavidade da bolsa de ar foi desproteinizado adicionando-se 20 µL de uma solução de ZnSO₄ e incubando em banho de gelo por 1 h, A seguir as amostras foram centrifugadas a 750 g por 15 minutos. Posteriormente 100 µL de sobrenadante foram diluídos em 200 µL de uma solução de cloreto de vanádio (VaCl₃ 0,8% p/v e HCl 3% p/v) e

foi adicionado a reação 300 μ L de solução de Griess (sulfanilamina 1% p/v, ácido fosfórico 5% v/v e n-1-naftiletilenodiamina 0,1% p/v). As amostras foram incubadas a 37° C por 40 minutos. A análise foi realizada por método colorimétrico em um leitor de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorbância lida no comprimento de onda de 540 nm.

As absorbâncias das amostras desconhecidas foram comparadas por interpolação utilizando-se uma curva com concentrações conhecidas de nitrito (0 a 150 μ M) e os resultados foram expressos em μ M.

3.10.DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS

As concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram medidos no fluído da bolsa de ar por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSVerse flow cytometer®) usando o kit comercial (Cytometric Bead Array CBA mouse Th1/Th2 Cytokine kit) de acordo com as instruções do fabricante.

Para este protocolo 50 μ L de lavado da bolsa de ar foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 50 μ L de uma solução contendo as “beads” de captura revestidas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e em seguida foram adicionados 50 μ L do reagente de detecção, que consiste em anticorpos monoclonais, específicos para as citocinas a serem testadas, conjugados com ficoeritrina.

Após duas horas de incubação a temperatura ambiente protegido da luz, foi adicionado 1 ml de tampão de lavagem em cada amostra e as mesmas foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 300 μ L de tampão de lavagem e posteriormente as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

Os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array® e comparados por interpolação utilizando-se uma curva padrão com

concentrações conhecidas das citocinas (20 a 5000 pg/mL) e os resultados foram expressos em pg/mL.

Os limites de detecção do método são de 0,9 pg/mL para o TNF- α , 0,5 pg/mL para IFN- γ , 0,1 pg/mL para IL-2, 0,03 pg/mL para IL-4, 1,4 pg/mL para IL-6, 16,8 pg/mL para IL-10 e 0,8 pg/mL para IL-17. As precisões inter-ensaios foram de $5,33 \pm 1,53\%$ para TNF- α , $3,33 \pm 0,58\%$ para IFN- γ , $3,67 \pm 1,16\%$ para IL-2, $5,00 \pm 1,73\%$ para IL-4, $4,67 \pm 1,15\%$ para IL-6, $12,33 \pm 7,10\%$ para IL-10 e $3,33 \pm 1,16\%$ para IL-17, e precisão intra-ensaios de $4,33 \pm 0,58\%$ para TNF- α , $2,67 \pm 0,58\%$ para IFN- γ , $2,67 \pm 0,58\%$ para IL-2, $3,33 \pm 0,58\%$ para IL-4, $4,67 \pm 1,53\%$ para IL-6, $12,00 \pm 8,54\%$ para IL10, e $2,33 \pm 0,58\%$ para IL-17. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.11.DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA p65 (p-p65-NF-Kb)

3.11.1. Dosagem de proteínas totais

Primeiramente para a padronização da concentração de proteínas nas amostras para análise dos níveis de fosforilação da proteína p65 NF- κ B, foi dosado o conteúdo total de proteínas de cada amostra utilizando-se o método descrito por Lowry (LOWRY et al., 1951).

Para isto, foi retirado 200 mg do tecido que recobre a camada interna da cavidade da bolsa de ar e homogeneizado em solução de PBS (pH 7,6, contendo NaCl (130 mM), Na₂PO₄ (5 mM) e KH₂PO₄ (1 mM)) para a obtenção do homogenato.

Posteriormente em uma placa de 96 poços, 5 μ L do homogenato foi adicionado a 95 μ L de água destilada, então foi adicionado 100 μ L do reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na₂CO₃ - 10%, sulfato de cobre: CuSO₄ 0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada) e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período foi adicionado 50 μ L de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água

destilada) e a mistura incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. A análise foi realizada em leitor de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorbância lida no comprimento de onda de 620 nm.

As absorbâncias das amostras desconhecidas foram comparadas por interpolação utilizando-se uma curva com concentrações conhecidas de albumina (0 a 40 $\mu\text{g/mL}$). Para a determinação da fosforilação da proteína p65-NF- κB a amostra foi ajustada para a concentração de 60 μg de proteínas totais.

3.11.2. Quantificação de p-p65-NF- κB

Para avaliar o efeito do etanercept na fosforilação da proteína p65 (NF- κB) foi utilizado um kit comercial Insta One Phospho-NF- κB p 65 (Ser536) ELISA Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) com anticorpos monoclonais específicos para a proteína p65 fosforilada de camundongos seguindo-se as recomendações dos fabricantes.

A análise foi realizada por método colorimétrico utilizando uma leitora de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorbância lida no comprimento de onda de 450 nm.

Os resultados foram expressos em relação ao grupo controle negativo, este representando a fosforilação basal da subunidade da p65-NF- κB .

3.12. APOPTOSE DE NEUTROFILOS

Para este protocolo 0,5 mL de PBS, pH 7,6 com 1% de azida de sódio foi adicionada a 0,5 mL de fluído da cavidade da bolsa de ar e posteriormente centrifugado a 500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com solução de PBS pH 7,6 e então ressuspensionado com 300 μL de tampão de ligação (ácido hidroxietil piperazina etanossulfônico pH 7,4 a 150 mM de NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl_2 e 1,8 mM de CaCl_2).

As células foram marcadas com anticorpo anti-Ly-6G conjugado com ficoeritrina (PE) e também anticorpo anti-CD11b conjugado a ficoeritrina-cianina PE-Cy7 (BD biosciences) que são

marcadores de neutrófilos ativados e posteriormente com Anexina-V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 7-actinomicina D (7-AAD) (BD biosciences) para análise da apoptose e necrose respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSVerse flow cytometer®) após a aquisição de 10000 eventos e a análise foi realizada utilizando-se o software FACS suite®. Os resultados de cada população, neutrófilos viáveis, neutrófilos em processo inicial de apoptose, neutrófilos em processo tardio de apoptose e neutrófilos em necrose foram expressos em porcentagem.

3.13. ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios (Migração leucocitária, exsudação, MPO, ADA, NO_x, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17, p-p65 NF κ B e apoptose) foram expressos utilizando-se a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados pelo programa de estatística GraphPad Prism® 5.00 (San Diego, CA, E.U.A.). As diferenças entre os grupos controle e tratados foram realizadas por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico) bicaudal. Quando necessário utilizou-se o teste t de Student (não-pareado). Para todas as análises valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. EFEITOS DO ETANERCEPT NA CONCENTRAÇÃO DE ESXUDATO E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Primeiramente avaliamos o efeito anti-inflamatório do etanercept sobre a migração de leucócitos e a exsudação.

A Dexametasona na dose de 0,5 mg/kg inibiu o número de leucócitos (% de inibição: $49,04 \pm 6,15\%$) ($P < 0,01$) os neutrófilos (% de inibição: $52,74 \pm 4,11\%$) ($P < 0,01$) os monócitos (% de inibição: $80,11 \pm 3,86\%$) ($P < 0,01$), e também a exsudação. (% de inibição: $31,01 \pm 6,42\%$) ($P < 0,01$) (Figuras 6A, B, C e D).

A indometacina na dose de 5 mg/kg inibiu o número de leucócitos totais (% de inibição: $68,75 \pm 2,60\%$) ($P < 0,01$) os neutrófilos (% de inibição: $67,53 \pm 3,06$) ($P < 0,01$) os monócitos (% de inibição: $88,72 \pm 3,19\%$) ($P < 0,01$) e também a exsudação (% de inibição: $50,37 \pm 1,60\%$) ($P < 0,01$) (Figuras 6A, B, C e D).

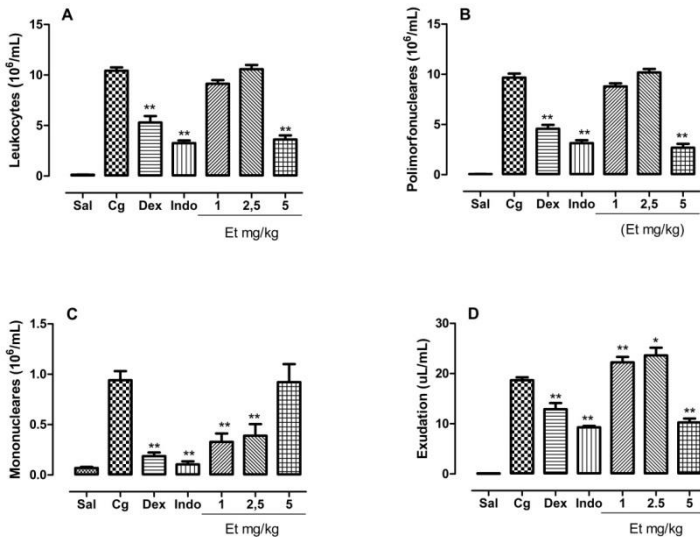
Na dose de 5 mg/kg de etanercept reduziu de forma significativa o número de leucócitos totais (% de inibição: $65,29 \pm 3,91\%$) ($P < 0,01$). A redução da celularidade ocorreu à custa da diminuição de neutrófilos (% de inibição: $72,18 \pm 3,93\%$) ($P < 0,01$) (Figuras 6B e D).

Na dose de 1 mg/kg e 2,5 mg/kg o etanercept reduziu os números de mononucleares (% de inibição: $65 \pm 21,28\%$ ($P < 0,01$) e $58,51 \pm 26,60\%$ ($P < 0,01$) respectivamente). Na dose de 5 mg/kg o etanercept não apresentou efeitos significativos sobre o número de mononucleares (Figuras 6C).

Na dose de 5 mg/kg o etanercept também foi capaz de reduzir significativamente a concentração de exsudato na cavidade da bolsa de ar (% de inibição: $44,92 \pm 4,21\%$) ($P < 0,05$) (figura 6A).

Por a dose de 5 mg/kg do etanercept ter sido a menor capaz de reduzir a celularidade total, o número de neutrófilos e a exsudação, esta dose foi selecionada para as análises posteriores.

Figura 6 – Efeito do etanercept (5 mg/kg) na indução da inflamação por Cg, sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares e na exsudação no modelo murino da bolsa de ar.



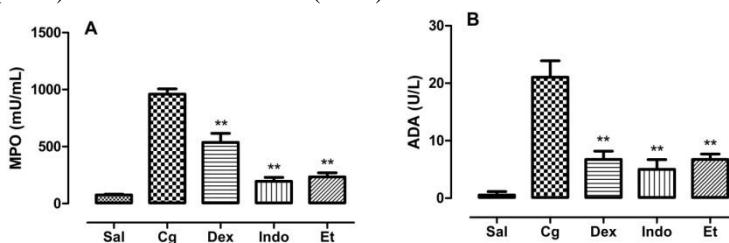
Efeito do etanercept (Et: 5 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg no modelo da bolsa de ar em camundongos sobre: (A): número total de leucócitos (B): polimorfonucleares, (C) mononucleares e (D) exsudação. Sal = animais tratados apenas com solução salina (0,9%), Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%) (s.c.) Dex = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), Indo = animais tratados com indometacina (5 mg/kg) administrada por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.). As colunas representam as médias \pm erro padrão e os asteriscos apresentam diferenças significativas entre os grupos. ** $P < 0,01$, teste ANOVA. N = 5 animais/grupo.

3.2. EFEITO DO ETANERCEPT SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS: MIELOPEROXIDASE (MPO) E ADENOSINA-DEAMINASE (ADA).

Os fármacos de referência, dexametasona (0,5 mg/kg) e indometacina (5 mg/kg) reduziram a atividade da MPO (% de inibição: Dex: $44,12 \pm 8,16\%$ e Indo: $79,71 \pm 3,68\%$) ($P < 0,01$) e da ADA (% de inibição Dex: $67,9 \pm 6,9\%$ e Indo: $76,05 \pm 8,05\%$) ($P < 0,01$) (Figuras 7A e B).

O etanercept (5 mg/kg) reduziu a atividade da MPO (% de inibição: $75,65 \pm 3,86\%$) ($P < 0,01$) e da ADA (% de inibição: $67,95 \pm 4,51\%$) ($P < 0,01$) (Figuras 7A e B).

Figura 7 – Efeito do etanercept sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA).



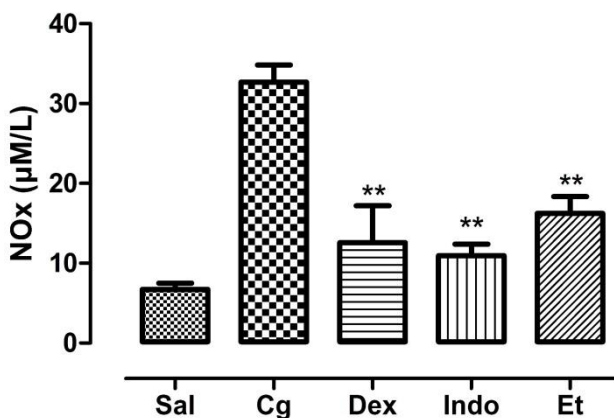
Efeito do etanercept (Et: 5 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg no modelo da bolsa de ar em camundongos sobre: (A): atividade da mieloperoxidase (MPO), (B): atividade da adenosina-deaminase (ADA). Sal = animais tratados apenas com solução salina (0,9%), Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%) (s.c.) Dex = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), Indo = animais tratados com indometacina (5 mg/kg) administrada por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), MPO = mieloperoxidase, ADA = adenosina-deaminase. As colunas representam as médias \pm erro padrão e os asteriscos apresentam diferenças significativas entre os grupos. ** $P < 0,01$, teste ANOVA. N = 5 animais/grupo.

3.3. EFEITO DO ETANERCEPT SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO (NO_x)

Os fármacos de referência, dexametasona (0,5 mg/kg) e a indometacina (5 mg/kg) reduziram as concentrações de NO_x (% de inibição Dex: $61,47 \pm 14,16\%$ e Indo: $66,36 \pm 4,37\%$) ($P < 0,01$) (Figura 8).

O etanercept (5 mg/kg) reduziu as concentrações de NO_x (% de inibição: $50,46 \pm 6,42\%$) ($P < 0,01$) (Figura 8).

Figura 8 – Efeito do etanercept sobre as concentrações de nitrato/nitrito:



Efeito do etanercept (Et: 5 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre as concentrações de nitrato/nitrito. Sal = animais tratados apenas com solução salina (0,9%), Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%) (s.c.) Dex = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), Indo = animais tratados com indometacina (5 mg/kg) administrada por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), NO_x = Concentrações de nitrato/nitrito. As colunas representam as médias \pm erro padrão e os asteriscos apresentam diferenças significativas entre os grupos. ** $P < 0.01$, teste ANOVA. N = 5 animais/grupo.

3.4. EFEITOS DO ETANERCEPT SOBRE A RESPOSTA Th1, Th2 e Th17.

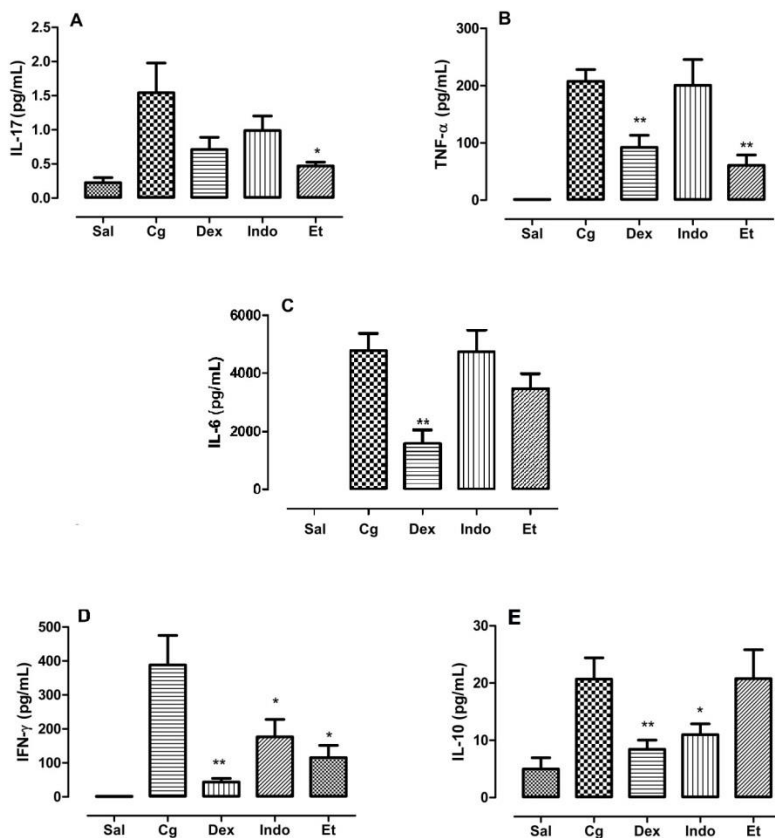
A indução da inflamação pela carragenina levou ao aumento das respostas Th1 e Th17 com consequente redução das citocinas características da resposta Th2. Houve o aumento nas concentrações das citocinas IFN- γ ($P < 0,01$), TNF- α ($P < 0,01$), IL-6 ($P < 0,01$), IL-10 ($P < 0,05$) e IL-17 ($P < 0,05$).

Não houve diferença nas concentrações das citocinas IL-2 e IL-4 entre nenhum dos grupos testados (Dados não demonstrados).

A dexametasona na concentração de 0,5 mg/kg reduziu as concentrações de IL-10 (% de inibição $59,28 \pm 7,83\%$) ($P < 0,01$), TNF- α (% de inibição $55,56 \pm 12,29\%$) ($P < 0,01$), IFN- γ (% de inibição $88,76 \pm 2,76$) ($P < 0,01$) e IL-6 (% de inibição $66,70 \pm 9,51\%$) ($P < 0,01$) (Figuras 9B, C e D).

A indometacina na concentração de 5 mg/kg reduziu as concentrações de IL-10 (% de inibição $46,86 \pm 9,13\%$) ($P < 0,05$) e IFN- γ (% de inibição $54,38 \pm 13,25\%$) ($P < 0,05$) (Figuras 9C e D).

O etanercept (5 mg/kg) inibiu apenas as concentrações de IL-17 (% de inibição: $69,35 \pm 3,55\%$) ($P < 0,05$) TNF- α (% de inibição: $70,67 \pm 8,69\%$) ($P < 0,01$) e IFN- γ (% de inibição: $70,36 \pm 9,36\%$) ($P < 0,05$) (Figuras 9A, B e C).

Figura 9 – Efeito do etanercept sobre a resposta Th1, Th2 e Th17.

Efeito do etanercept (Et: 5 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre as concentrações de (A): IL-17A, (B): TNF- α , (C): IL-6 (D): IFN- γ , (E) IL-10. Sal = animais tratados apenas com solução salina (0,9%), Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%) (s.c.) Dex = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), Indo = animais tratados com indometacina (5 mg/kg) administrada por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), IL = interleucinas, TNF- α = fator de necrose tumoral alfa, IFN- γ = interferon gamma. As colunas representam as médias \pm erro padrão e os asteriscos apresentam diferenças significativas entre os grupos teste em relação

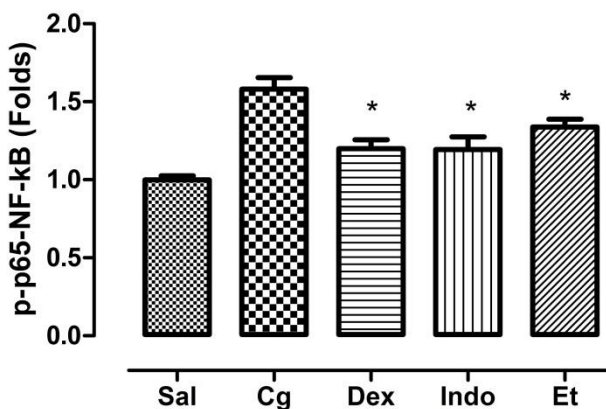
ao grupo controle positivo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, teste T de Student. $N = 5$ animais/grupo.

3.5. EFEITOS DO ETANERCEPT NA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA P65 (p-p65-NFkB).

Os fármacos de referência dexametasona (0,5 mg/kg) e a indometacina reduziram a concentração de p-p65-NFkB (% de inibição Dex: $65.52 \pm 8.6\%$ e Indo: $67.24 \pm 13.8\%$) ($P < 0,05$) (Figura 10).

O etanercept (5 mg/kg) reduziu a concentração de p-p65-NFkB (% de inibição: $41.38 \pm 8.6\%$) ($P < 0,05$) (Figura 10).

Figura 10 – Efeito do etanercept na fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF-kB)



Efeito do etanercept (Et: 5 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre a concentração de p-p65-NFkB. Sal = animais tratados apenas com solução salina (0,9%), Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%) (s.c.) Dex = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), Indo = animais tratados com indometacina (5 mg/kg) administrada por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), p-p65-NFkB = proteína p-65 do fator nuclear kappa B fosforilada. As colunas representam as médias \pm erro padrão e os asteriscos apresentam diferenças significativas entre os grupos teste

em relação ao grupo controle positivo. * $P < 0,05$, teste T de Student. $N = 5$ animais/grupo.

3.6. EFEITOS DO ETANERCEPT NA APOPTOSE DE NEUTROFILOS.

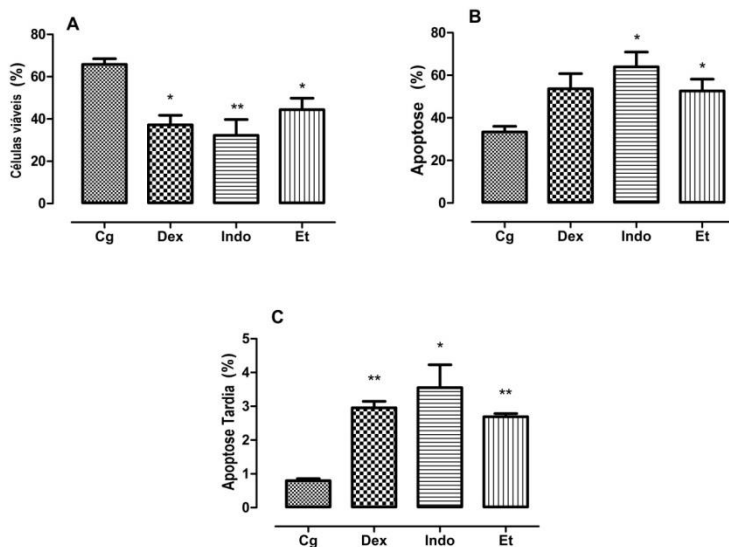
A dexametasona reduziu a porcentagem de células viáveis (% de inibição $43,47 \pm 6,87$ %) ($P < 0,05$) sem aumento significativo na proporção de células em apoptose ($P > 0,05$), embora tenha havido um aumento na porcentagem de células em apoptose tardia (% de aumento $270 \pm 23,25$ %) ($P < 0,01$)

A indometacina (5 mg/kg) reduziu a proporção de células viáveis no lavado da bolsa de ar (% de inibição $51,06 \pm 11,37$ %) ($P < 0,01$) aumentando a proporção de células em apoptose (% de aumento $91,89 \pm 20,93$ %) ($p < 0,05$) e células em apoptose tardia (% de aumento $343,75 \pm 84,38$ %) ($P < 0,05$) (Figura 11A, B e C).

O etanercept (5 mg/kg) reduziu significativamente o número de neutrófilos viáveis na cavidade da bolsa de ar (% de inibição: $32,52 \pm 8,24$ %) ($P < 0,05$). Observou-se ainda que o fármaco aumentou a porcentagem de neutrófilos em apoptose e apoptose tardia (% de aumento $58,26 \pm 16,52$ % ($P < 0,05$) e $236,25 \pm 11,13$ % ($P < 0,01$) respectivamente).

A necrose respondeu por menos de 0,5 % das células em todos os grupos analisados, resultados não mostrados.

Figura 11 – Efeitos do etanercept sobre a apoptose de neutrófilos.



Efeito do etanercept (Et: 5 mg/kg) administrado 0,5 h antes da Cg, no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre apoptose. (A): Porcentagem de células viáveis (B): Porcentagem de células em apoptose, (C): Porcentagem de células em apoptose tardia. A porcentagem de células em necrose correspondeu a menos de 0,5% da população. Sal = animais tratados apenas com solução salina (0,9%), Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%) (s.c.) Dex = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.), Indo = animais tratados com indometacina (5 mg/kg) administrada por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação por Cg (s.c.). As colunas representam as médias \pm erro padrão e os asteriscos apresentam diferenças significativas entre os grupos teste em relação ao grupo controle positivo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, teste T de Student. N = 5 animais/grupo.

4. DISCUSSÃO

Após 24 horas da indução da inflamação por carragenina, observou-se um aumento na migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos para a cavidade da bolsa de ar, na exsudação, na atividade de enzimas relacionadas com o processo inflamatório, como a mieloperoxidase e adenosina-deaminase, nas concentrações de nitrato e nitrito e de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17; sem o aumento das citocinas IL-2 e IL-4. Isso indica que o modelo apresenta uma resposta predominantemente do tipo Th1 e Th17.

Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura, pelo qual a administração de um agente flogístico, como a carragenina ou lipopolissacarídeo (LPS), é capaz de iniciar um processo inflamatório local que se assemelha ao encontrado na artrite reumatóide, doença esta que apresenta como característica elevação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 com redução nas concentrações de IL-4 (PERRICONE et al., 2011). Outra característica deste modelo é que, por se difundir menos que o LPS, a carragenina tende a ter poucos efeitos sistêmicos quando administrada diretamente na bolsa de ar (ROMANO et al., 1997; ELLIS et al., 2000; BENINCÁ et al., 2007; VIGIL et al., 2008).

Neste trabalho, percebeu-se a importante atividade anti-inflamatória exercida pelo etanercept. O tratamento dos animais com este fármaco na dose de 5 mg/kg foi capaz de reduzir a atividade de enzimas envolvidas na inflamação, as concentrações de citocinas pró inflamatórias e o número de leucócitos presentes na cavidade da bolsa de ar, além de inibir o exsudato na bolsa de ar.

O etanercept administrado por via i.p. na dose de 5 mg/kg reduziu as concentrações do TNF- α no fluido da cavidade da bolsa de ar nos camundongos, assim como as concentrações de IL-17A e IFN- γ . Isso indica que o tratamento com este medicamento leva a uma inibição das respostas Th1 e Th17, embora não tenha sido observada a indução da resposta Th2. Interessante notar que o etanercept na dose testada, mesmo sendo suficiente para reduzir vários parâmetros inflamatórios, não levou a redução das concentrações de IL-6.

A inibição da IL-17A pelo etanercept evidencia seu papel protetor na artrite reumatoide, pois esta citocina possui papel importante no curso da doença, é encontrada em altas concentrações na sinóvia de pacientes com AR, está relacionada com a inflamação e o processo de erosão óssea (SHABGAH et al., 2014).

O papel do IFN- γ em modelos animais de artrite é complexo, podendo apresentar tanto papel patogênico como protetor. Embora seja capaz de induzir a inflamação, ele também inibe a diferenciação de células Th17 e reduz, assim, a inflamação (SARKAR et al., 2009).

A administração de anticorpos inibidores do IFN- γ em diferentes fases da doença parece indicar que esta citocina possui um papel patogênico no início da AR, mas pode possuir papel protetor nas fases mais avançadas devido à sua capacidade de inibir a diferenciação das células Th17 (SARKAR et al., 2009).

A redução concomitante das concentrações de IL-17A e IFN- γ pode ser um mecanismo pelo qual este medicamento apresenta efeitos benéficos superiores quando administrado logo no início do curso da doença. A redução destas citocinas pode ser decorrente da inibição da ligação do TNF- α ao seu receptor, que reduz a via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B.

O NF- κ B promove o aumento da transcrição de várias citocinas pró inflamatórias, dentre elas citam-se o TNF- α e o IFN- γ e a IL-23 (TAN et al., 2007). Esta citocina é necessária para a manutenção do fenótipo das células Th-17 e subsequente produção de IL-17A.

Além da produção da síntese de citocinas pró-inflamatórias, o estímulo inflamatório paradoxalmente leva ao aumento da síntese de IL-10 também pela ativação das vias do NF- κ B. Esta citocina possui grande potencial anti-inflamatório servindo como controle da inflamação (KWILASZ et al., 2014).

Nos animais tratados com o fármaco de referência, dexametasona e indometacina, observou-se uma redução na concentração de IL-10. No entanto, no tratamento com etanercept a concentração de IL-10 se manteve próxima aos níveis encontrados nos animais não tratados, mesmo tendo havido a redução da sinalização da via do NF- κ B.

Uma vez que a IL-10 possui papel regulador no processo inflamatório, e é conhecida por conferir proteção ao dano articular causado pela artrite, além de promover indiretamente a redução da diferenciação de células Th17, ao reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1- β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α (KWILASZ et al., 2014). O fato de o etanercept não reduzir suas concentrações é benéfico no controle da inflamação.

A diminuição na formação do exsudato pode ser atribuída a inibição da formação de NOx.

O NOx é sintetizado pela NOS2 e está presente em altas concentrações em processos inflamatórios. Sua função é eliminar os patógenos via formação de espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito (LONKAR e DEDON, 2011), além de atuar no endotélio aumentando a permeabilidade vascular e a exsudação (DOS REIS et al., 2014).

Ao ativar o seu receptor, o TNF- α promove o aumento na expressão da NOS2, elevando, assim, as concentrações de óxido nítrico e, conseqüentemente, o exsudato e dano tecidual por estresse oxidativo (SHEN et al., 2014). Desta forma, é possível que o etanercept possa promover a redução da ativação da NOS2 e, conseqüentemente, das concentrações de óxido nítrico, ao reduzir as concentrações de TNF- α no local da inflamação.

A redução do número leucócitos ocorreu principalmente devido à diminuição do número de neutrófilos pela redução da migração destas células no sítio inflamatório e pelo aumento da apoptose de neutrófilos que já migraram para a bolsa de ar.

A redução da migração pode ainda ser resultado da diminuição das concentrações IFN- γ e IL-17 e da redução da ativação do NF-kB, causados pela inibição do TNF- α . Estes fatores possuem a propriedade de aumentar a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio recrutando assim leucócitos ao sítio inflamatório.

A ativação da via de sinalização do TNF- α pode levar tanto à resposta regenerativa quanto à morte celular (WHITE et al., 2012). Sendo que a capacidade de induzir ou não a apoptose depende da célula alvo. Estudos demonstraram que etanercept induz a apoptose em

macrófagos sinoviais ativados (SZALAY et al., 2011), embora não induza apoptose em linfócitos e monócitos circulantes e em queratinócitos de pacientes com psoríase (TATLIGAN et al., 2010).

Nos experimentos do presente trabalho, o etanercept demonstrou capacidade de aumentar a apoptose nos neutrófilos ativados que migraram para o fluído da bolsa de ar.

O aumento da apoptose observado pode ser devido ao fato de que a redução das concentrações do TNF- α promove a redução da ativação da via do NF- κ . Esta via, quando ativada, promove a expressão de genes antiapoptóticos em células inflamatórias (URBANO et al., 2014), o que inclui os neutrófilos (SABROE et al., 2005).

Os neutrófilos apresentam um papel importante tanto no início quanto no progresso da artrite reumatoide pela produção de espécies reativas de oxigênio, sendo também fontes de peptídeos citrulinados via NETs. Uma vez ativados no sítio inflamatório, apresentam um retardo no processo de apoptose, aumentando, assim, o seu tempo de vida, sendo que a apoptose destas células e a subsequente remoção dos corpos apoptóticos é essencial para a resolução da inflamação (WRIGHT et al., 2014).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente em grande parte nos grânulos primários de neutrófilos (KUMAR e SHARMA, 2010), sendo considerado um marcador de atividade de neutrófilos (FRODE e MEDEIROS, 2001). A redução da atividade desta enzima encontrada neste estudo pode ser causada pelo efeito do etanercept sobre a inibição da migração de neutrófilos e/ou sobre o aumento da apoptose destas células no sítio inflamatório. A redução na atividade da MPO também pode ser indicativa de menor grau de ativação das células que migraram para a bolsa de ar nos animais tratados com o etanercept.

Os efeitos do tratamento com etanercept sobre os neutrófilos podem ser um dos motivos pelo qual o uso deste medicamento logo no início do curso da doença possa ter efeitos benéficos para o paciente.

Nas doses mais baixas, 1 mg/kg e 2 mg/kg, apesar de o etanercept não ter reduzido as concentrações de leucócitos totais, houve redução da porcentagem de mononucleares. Uma vez que os mononucleares possuem papel importante na artrite reumatoide, estes resultados podem

indicar que, mesmo em doses baixas, este medicamento pode possuir efeito protetor nas fases mais avançadas da doença.

O tratamento com etanercept foi capaz de reduzir a atividade da adenosina-deaminase no fluído da bolsa de ar.

A adenosina-deaminase (ADA) é uma enzima relacionada com o metabolismo das purinas e possui papel importante na regulação do sistema imune (ZAKERI et al., 2012). Esta enzima é responsável pela metabolização da adenosina. A adenosina, quando presente em baixas concentrações no local da inflamação, liga-se em seus receptores de baixa afinidade do tipo A₁ promovendo efeitos pró-inflamatórios (BARLETTA et al., 2012).

A redução da atividade da ADA pelo etanercept pode ser mais um mecanismo pelo qual este fármaco atua na inflamação. A inibição da ADA promove um aumento da concentração de adenosina. A adenosina, quando presente em grandes concentrações, se liga aos receptores de baixa afinidade A_{2a} e A_{2b} (BARLETTA et al., 2012), reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da liberação de IL-10 por monócitos (ANTONIOLI et al., 2012).

Tendo em vista que a atividade da ADA se encontra elevada na artrite reumatoide e está relacionada com a severidade do processo inflamatório (ANTONIOLI et al., 2012), e com a atividade das células mononucleares (FRODE e MEDEIROS, 2001), sua redução demonstra outro mecanismo anti-inflamatório do etanercept.

Em 2015 vários agentes biológicos, incluindo o etanercept, vão perder a patente, isso levou a procura pelo desenvolvimento de medicamentos biossimilares (WILLRICH et al., 2014). Portanto, há a necessidade de se conhecer as características dessa classe de medicamentos para que seja possível a formulação de critérios robustos de comparação da eficácia e segurança dos mesmos (URBANO et al., 2014). Os efeitos do etanercept observados neste trabalho sobre os marcadores inflamatórios e exsudação e sobre a migração e apoptose de neutrófilos contribuem para um melhor entendimento sobre a ação in vivo deste medicamento sobre a inflamação.

Os dados obtidos indicam que a ação do etanercept sobre neutrófilos pode ser útil para o tratamento da doença já em suas fases

iniciais, embora mais estudos sejam necessários para confirmar se esse efeito se estende também a humanos.

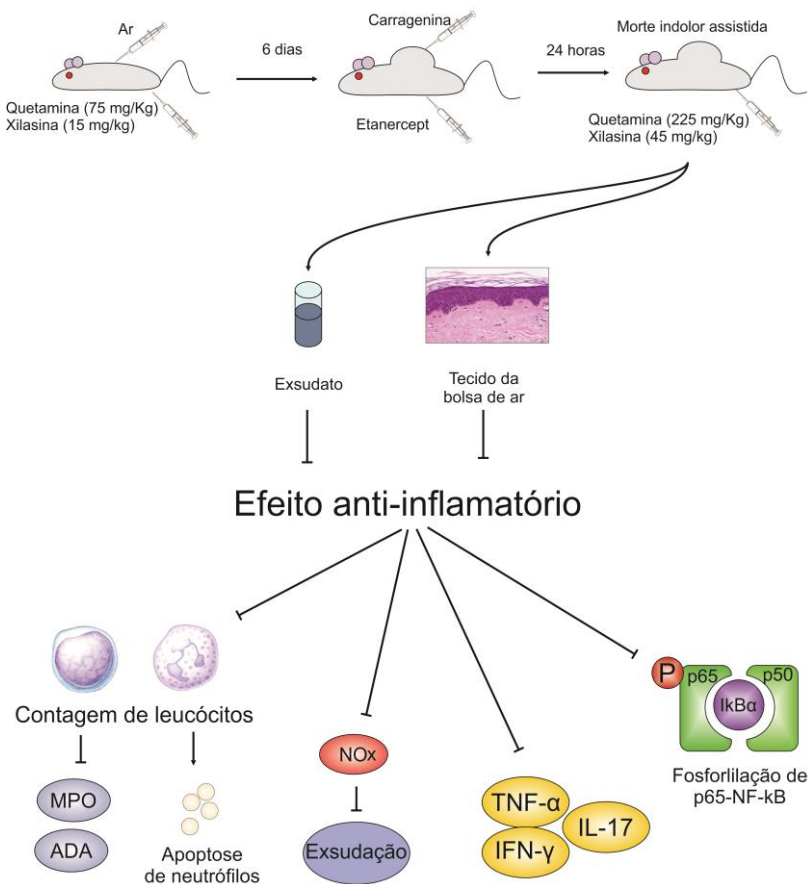
5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste estudo confirmam que o etanercept possui propriedades anti-inflamatórias, demonstrando redução da exsudação, infiltrado de leucócitos principalmente de neutrófilos, aumento da apoptose de neutrófilos contribuindo assim para a resolução do processo inflamatório.

Esses efeitos podem ser causados pela redução dos mediadores pró inflamatórios, como o óxido nítrico e enzimas como a adenosina-deaminase e a mieloperoxidase. Ao reduzir as concentrações de TNF- α o etanercept promoveu a redução da ativação das vias do NF-kB e por consequência a redução da transcrição dos genes relacionados a citocinas pró inflamatórias, e ainda induzindo a apoptose por esta mesma via.

Estes resultados são importantes para se adicionar ao que já é conhecido sobre os efeitos dos agentes inibidores do TNF- α e assim possibilitar o estabelecimento de critérios confiáveis para a análise dos efeitos dos novos agentes biossimilares que tendem a entrar no mercado em um futuro próximo.

Figura 12 – Resumo gráfico do programa experimental e resultados do trabalho.



A Administração do etanercept (5 mg/kg) foi capaz de reduzir a contagem de leucócitos, exsudação, atividades da enzima ADA, MPO, das concentrações de nitrato/nitrito, TNF-α, IFN-γ e IL-17, reduzir os níveis de fosforilação de p65-NF-kB além de induzir apoptose em neutrófilos no modelo murino da bolsa de ar. ADA: adenosina deaminase; IFN-γ: Interferon-gamma; IL-17: Interleucina-17; NF-kB: Fator de transcrição nuclear kappa B; NOx: metabólitos do nitrato/nitrito; TNF-α: Fator de necrose tumoral-alfa. —→ = Inibição.

Fonte: elaborado pelo autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 745-56, 2003.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842-62, 2012.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discov Today**, v. 19, n. 8, p. 1051-68, 2014.

ANTONIOLI, L. et al. The blockade of adenosine deaminase ameliorates chronic experimental colitis through the recruitment of adenosine A2A and A3 receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 335, n. 2, p. 434-42, 2010.

ANVISA. Medicamentos Biológicos para o Tratamento da Artrite Reumatóide. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, v. Ano VI nº19, 2012.

AVRAMIDIS, G. et al. The role of endothelial cell apoptosis in the effect of etanercept in psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 163, n. 5, p. 928-34, 2010.

BAO, Y.; CAO, X. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: A comprehensive review. **J Autoimmun**, v. 55C, p. 10-23, 2014.

BARLETTA, K. E.; LEY, K.; MEHRAD, B. Regulation of neutrophil function by adenosine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 4, p. 856-64, 2012.

BAYER, A. L.; PUGLIESE, A.; MALEK, T. R. The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation. **Immunol Res**, v. 57, n. 1-3, p. 197-209, 2013.

BEDOYA, S. K. et al. Th17 cells in immunity and autoimmunity. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 986789, 2013.

BENINCÁ, J. P. et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.

BHATTACHARYYA, S. et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFkappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 283, n. 16, p. 10550-8, 2008.

CALABRESE, L. H.; ROSE-JOHN, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 12, p. 720-727, 2014.

CHANG, S. H.; DONG, C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. **Cell Signal**, v. 23, n. 7, p. 1069-75, 2011.

CITRO, A.; BARNABA, V.; MARTINI, H. From T cell apoptosis to chronic immune activation in inflammatory diseases. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 164, n. 2, p. 140-6, 2014.

DE BRUIN, A. M.; VOERMANS, C.; NOLTE, M. A. Impact of interferon-gamma on hematopoiesis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2479-2486, 2014.

DE LIZ, R. et al. Activation of human neutrophils by *Esenbeckia leiocarpa*: comparison between the crude hydroalcoholic extract (CHE) and an alkaloid (Alk) fraction. **J Inflamm (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 19, 2012.

DEMCHENKO, A. P. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. **Exp Oncol**, v. 34, n. 3, p. 263-8, 2012.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-50, 2010.

DOS REIS, G. O. et al. Croton antispyhiliticus Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 115-26, 2014.

ELLIS, L. et al. Activation of the transcription factor NF-kappaB in the rat air pouch model of inflammation. **Ann Rheum Dis**, v. 59, n. 4, p. 303-7, 2000.

EMERY, P. et al. Sustained remission with etanercept tapering in early rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 371, n. 19, p. 1781-92, 2014.

FERREIRA, L. R. et al. Interferon-gamma and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World J Cardiol**, v. 6, n. 8, p. 782-90, 2014.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 4, p. 223-7, 2001.

GABAY, C. et al. Biological agents in monotherapy for the treatment of rheumatoid arthritis. **Swiss Med Wkly**, v. 144, p. w13950, 2014.

GASPARINI, C. et al. NF-kappaB pathways in hematological malignancies. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 11, p. 2083-102, 2014.

GERONDAKIS, S. et al. NF-kappaB control of T cell development. **Nat Immunol**, v. 15, n. 1, p. 15-25, 2014.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine Deaminase: Colorimetric method. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. 3rd: Academic Press, v.4, 1984. p.315-323.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

HEO, Y. J. et al. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. **Immunol Lett**, v. 127, n. 2, p. 150-6, 2010.

HIRANO, T. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. **Front Immunol**, v. 5, p. 456, 2014.

INGARAMO, P. I. et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. **Mol Immunol**, v. 48, n. 12-13, p. 1397-407, 2011.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Front Immunol**, v. 5, p. 514, 2014.

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflamm Res**, v. 60, n. 5, p. 483-91, 2011.

KANG, S.; TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. **Int Immunol**, v. 27, n. 1, p. 21-29, 2015.

KAPLAN, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 5, p. 219, 2013.

KIKUTA, J.; ISHII, M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 2, p. 226-34, 2013.

KOCZAN, D. et al. Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-TNF alpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 3, p. R50, 2008.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, 2013.

KORCZOWSKA, I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. **World J Orthop**, v. 5, n. 4, p. 544-9, 2014.

KUEK, A.; HAZLEMAN, B. L.; OSTOR, A. J. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. **Postgrad Med J**, v. 83, n. 978, p. 251-60, 2007.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 11, p. 1325-34, 2010.

KWILASZ, A. J. et al. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. **Neuropharmacology**, 2014.

LEE, H. et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of etanercept using logistic regression analysis. **Clin Pharmacol Ther**, v. 73, n. 4, p. 348-65, 2003.

LONKAR, P.; DEDON, P. C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. **Int J Cancer**, v. 128, n. 9, p. 1999-2009, 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUIKING, Y. C. et al. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 10, p. E1177-89, 2012.

LYNDE, C. W. et al. Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. **J Am Acad Dermatol**, v. 71, n. 1, p. 141-50, 2014.

MAHMUD, S. A.; MANLOVE, L. S.; FARRAR, M. A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. **JAKSTAT**, v. 2, n. 1, p. e23154, 2013.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, 2011.

MARTINEZ, M. M.; REIF, R. D.; PAPPAS, D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. **Analytical Methods**, v. 2, n. 8, p. 996-1004, 2010.

MATCHAM, F. et al. The impact of rheumatoid arthritis on quality-of-life assessed using the SF-36: a systematic review and meta-analysis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 44, n. 2, p. 123-30, 2014.

MAZZA, J.; ROSSI, A.; WEINBERG, J. M. Innovative uses of tumor necrosis factor alpha inhibitors. **Dermatol Clin**, v. 28, n. 3, p. 559-75, 2010.

MOCSAI, A.; KOVACS, L.; GERGELY, P. What is the future of targeted therapy in rheumatology: biologics or small molecules? **BMC Med**, v. 12, p. 43, 2014.

MUKHOPADHYAY, S.; HOIDAL, J. R.; MUKHERJEE, T. K. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. **Respir Res**, v. 7, p. 125, 2006.

MURATA, K. et al. MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 3, p. 549-59, 2014.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-82, 2010.

NGUYEN, D. P. et al. Recent insights into NF-kappaB signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. **BJU Int**, v. 114, n. 2, p. 168-76, 2014.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 695-708, 2011.

PAVLOVIC, V. et al. Serum levels of IL-17, IL-4, and INFgamma in Serbian patients with early rheumatoid arthritis. **J Res Med Sci**, v. 19, n. 1, p. 18-22, 2014.

PERRICONE, C.; CECCARELLI, F.; VALESINI, G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 10, p. 599-608, 2011.

PINEDA, M. A. et al. Lessons from helminth infections: ES-62 highlights new interventional approaches in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol**, v. 177, n. 1, p. 13-23, 2014.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, 1993.

ROMANO, M. et al. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. **Mediators Inflamm**, v. 6, n. 1, p. 32-8, 1997.

ROSENBLUM, H.; AMITAL, H. Anti-TNF therapy: safety aspects of taking the risk. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 9, p. 563-8, 2011.

SABROE, I.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. **Clin Infect Dis**, v. 41 Suppl 7, p. S421-6, 2005.

SAKKAS, L. I. et al. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. **Autoimmun Rev**, 2014.

SALLES, A.; ROMANO, A.; FREUDENTHAL, R. Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory. **J Physiol Paris**, 2014.

SANJABI, S. et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 447-53, 2009.

SARKAR, S. et al. Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. R158, 2009.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHURGERS, E.; BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 12, p. 917-26, 2011.

SHABGAH, A. G.; FATTAHI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 31, n. 4, p. 256-61, 2014.

SHEN, S. C. et al. Reactive oxygen species-dependent nitric oxide production in reciprocal interactions of glioma and microglial cells. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 12, p. 2015-26, 2014.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 762-74, 2011.

SINGH, R. P. et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, 2014.

SMIGIEL, K. S. et al. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. **Immunol Rev**, v. 259, n. 1, p. 40-59, 2014.

SZALAY, B. et al. Successful use of tocilizumab in a patient with rheumatoid arthritis following severe pancytopenia during etanercept therapy. **J Clin Rheumatol**, v. 17, n. 7, p. 377-9, 2011.

TAN, J. K. et al. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 12, n. 1, p. 38-45, 2007.

TANAKA, T.; HISHITANI, Y.; OGATA, A. Monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis: comparative effectiveness of tocilizumab with tumor necrosis factor inhibitors. **Biologics**, v. 8, p. 141-53, 2014.

TATLICHAN, S. et al. Etanercept does not have an apoptosis-inducing effect on psoriatic keratinocytes. **J Dermatolog Treat**, v. 21, n. 5, p. 306-10, 2010.

THALAYASINGAM, N.; ISAACS, J. D. Anti-TNF therapy. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 549-67, 2011.

THAPA, R. J. et al. NF-kappaB protects cells from gamma interferon-induced RIP1-dependent necroptosis. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 14, p. 2934-46, 2011.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacol Ther**, v. 117, n. 2, p. 244-79, 2008.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 443-52, 2007.

URBANO, P. C.; SOCCOL, V. T.; AZEVEDO, V. F. Apoptosis and the FLIP and NF-kappa B proteins as pharmacodynamic criteria for biosimilar TNF-alpha antagonists. **Biologics**, v. 8, p. 211-20, 2014.

VANDOOOREN, J. et al. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 4745-56, 2013.

VIGIL, S. V. et al. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. **Transpl Immunol**, v. 19, n. 1, p. 25-9, 2008.

VIVAR, N.; VAN VOLLENHOVEN, R. F. Advances in the treatment of rheumatoid arthritis. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 31, 2014.

WHITE, L. E. et al. TNFR1-dependent pulmonary apoptosis during ischemic acute kidney injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 303, n. 5, p. L449-59, 2012.

WILLRICH, M. A.; MURRAY, D. L.; SNYDER, M. R. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. **Transl Res**, 2014.

WINTERBOURN, C. C. et al. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. **J Biol Chem**, v. 281, n. 52, p. 39860-9, 2006.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Exp Oncol**, v. 34, n. 3, p. 255-62, 2012.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 10, p. 593-601, 2014.

WYLLIE, A. H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Mol Neurobiol**, v. 42, n. 1, p. 4-9, 2010.

XIAO, L.; LIU, Y.; WANG, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 3, p. H317-25, 2014.

YANG, J. et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 10, p. 493-500, 2014.

YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 698313, 2014.

ZAKERI, Z. et al. Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Int J Clin Exp Med**, v. 5, n. 2, p. 195-200, 2012.

ANEXOS

ANEXO I

Protocolo de aprovação no Comitê de Ética na Experimentação com Animais

PP00757

Título

Metodologias utilizadas no laboratório de pesquisa em Imunologia para ensaios in vivo

Data de Entrada

24/04/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 44/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Silvia Fröde, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

A CEUA solicita a alteração do método de punção retro-orbital. Esta via não é adequada para injeção intravenosa de substâncias, mesmo sob anestesia. A aprovação do protocolo está condicionada a implementação de outra via para administração intravenosa, de baixo dano tecidual. Verificar na página da CEUA um método adequado e comunique qual será implementado.

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: cinco mil seiscentos e dezesseis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ

SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 05/09/2016

Data 05/06/2012

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**



ANEXO II

Artigo submetido

- Etanercept administration prevents the inflammatory response induced by carrageenan in the murine air pouch model, ao periódico *International immunopharmacology*.

13.01.2015

International Immunopharmacology

Contact us  Help  My IIS files available for consolidated users... [more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)



username: submit@iis.oxfordjri.org


Switch To: [Author](#) | [Editor](#) | [Go to: !\[\]\(bde5326fc513602bcb315433f52b2412_img.jpg\) My IIS Hub](#)

Version: [IIS 2015.1](#)



Submissions Being Processed for Author Tania Sibila Frode, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display:   results per page.

 Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
	A#	A#	A#	A#	A#
View Submission Send E-mail	ijppp-15-00075	Etanercept administration prevents the inflammatory response induced by carrageenan in the murine air pouch model	Jan 21, 2015	Jan 30, 2015	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display:   results per page.

[<< Author Main Menu](#)